

N° D'ORDRE

89

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Julien LEMARCHANDS

*Agrégé des Sciences Naturelles
Professeur au Lycée Ampère*

1^{re} THÈSE

**Contribution à l'étude des transformations et plus spécialement
de la saponification des réserves grasses dans les graines,
au cours de la germination.**

2^{me} THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 11 Juin 1929 devant la Commission d'examen

MM. COUTURIER.
VANÉY.
ROMAN.

CAHORS

IMPRIMERIE TYPOGRAPHIQUE A. COUESLANT
(personnel intéressé)

1929

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Julien LEMARCHANDS

*Agrégé des Sciences Naturelles
Professeur au Lycée Ampère*

1^{re} THÈSE

**Contribution à l'étude des transformations et plus spécialement
de la saponification des réserves grasses dans les graines,
au cours de la germination.**

2^{me} THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 11 Juin 1929 devant la Commission d'examen

MM. COUTURIER.

VANEY.

ROMAN.

CAHORS

IMPRIMERIE TYPOGRAPHIQUE A. COUESLANT
(personnel intéressé)

1929

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. DEPÉRET, O. *,  I., , Membre de l'Institut.

Assesseur

M. KÆHLER, O. *,  I., , Correspondant de l'Institut.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, O. *,  I. — GÉRARD, O. *,  I.,  C. — RIGOLLOT, *,  I. —
VAUTIER,  I. — LE VASSEUR, *,  I. — OFFRET, *,  I., .

Professeurs titulaires

MM. DEPÉRET, O. *,  I., , Membre de l'Institut, *Géologie*.
KÆHLER, O. *,  I., , Correspondant de l'Institut, *Zoologie*.
DULAC, *,  I., *Calcul différentiel et intégral*.
MASCART, *,  I., , *Astronomie physique*.
GRIGNARD, O. *,  I.,  P. N., Membre de l'Institut, *Chimie générale*.
SIRE,  I., , *Mécanique rationnelle et appliquée*.
MEUNIER, *,  I., *Chimie industrielle*.
COUTURIER,  I., , *Chimie agricole*.
BEAUVÉRIE, *,  I., , *Botanique*.
THOVERT, *,  I., , *Physique*.
CARDOT,  I., *Physiologie générale et comparée*.
VANEY, *,  I., *Zoologie*.
LONGCHAMON, *,  I., *Minéralogie théorique et appliquée*.

Professeurs titulaires (sans chaire)

MM. LOCQUIN, *,  I., *Chimie générale*.
JOB,  I., *Chimie physique*.
H. DOUIN,  I., *Botanique*.
DÉJARDIN,  I., *Physique*.
ROMAN (F.)  I., *Géologie*.
LEMARCHANDS,  I., *Chimie industrielle*.

Maîtres de conférences et Chargés de cours complémentaires

MM. EYRAUD,  I., *Mathématiques*.
RICHE,  I., *Géologie*.
BONNET,  I., *Zoologie appliquée et Zootechnie*.
MAYET, *,  I., *Anthropologie*.
PELOSSE,  I., *Sériciculture*.
DONCIEUX,  I., *P. C. N. Supérieur*.
SEYEWETZ, *,  I., *Matières colorantes artificielles*.
M^{me} BACHRACH,  I., *Physiologie*.



Secrétaire

M^{me} NÉTIEU, .

CONTRIBUTION

à l'étude des transformations

et plus spécialement de

la Saponification des réserves grasses

dans les graines

au cours de la germination

A MA MÈRE, A MA FEMME, A MON FRÈRE.

CONTRIBUTION

à l'étude des transformations

et plus spécialement de

LA SAPONIFICATION DES RÉSERVES GRASSES

dans les graines oléagineuses

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'étude de la digestion des réserves grasses dans les graines oléagineuses, a fait l'objet, depuis trois-quarts de siècle, d'assez nombreux travaux. Ces travaux peuvent se classer en deux catégories : les uns accomplis par des botanistes ont observé les phénomènes s'accomplissant dans la germination des graines oléagineuses, surtout au point de vue des échanges de matière. Ils ont constaté la disparition des graisses au cours de cette germination, l'apparition parallèle de composés hydrocarbonés, mais n'ont pas, en général, étudié les phases chimiques d'une façon plus précise de ces transformations. Leurs observations, en définitive, se sont bornées à l'étude des termes extrêmes de la chaîne liant la disparition des réserves grasses à l'apparition des hydrates de carbone. Parmi ces auteurs, un certain nombre ont constaté la saponification des graisses, l'apparition des acides gras, mais n'ont pu déceler la présence de glycérol dans les germinations. D'autres ont décelé qualitativement et quantitativement, les termes sucrés apparaissant au cours de la germination, mais le plus souvent s'en sont tenus, quant à leur distinction, à la notion de termes réducteurs ou non réducteurs, ils ont

assez souvent établi les rapports quantitatifs entre les graisses disparues, les acides gras libérés et les hydrates de carbone apparus à différents stades du phénomène germinatif.

Les travaux de Sachs (1859), Müntz (1860), Detmer (1875), Laurent (1887), Mesnard (1893), Leclerc du Sablon (1895-1897), Maquenne (1898), Mazé (1902), Miller (1912), Ivanow (1912), appartiennent, d'après leurs résultats, à cette première catégorie de recherches.

D'autres travaux, dus, plus spécialement, à des chimistes ont eu surtout pour but d'éclaircir la façon dont s'opérait la saponification, d'en connaître la cause, d'en étudier les conditions favorisantes ou défavorisantes, par l'emploi de réactifs chimiques déterminés.

Ces recherches ont été généralement interrompues aux premiers termes de la transformation des graisses dans les graines oléagineuses. En effet, après avoir découvert les agents saponifiants, les auteurs ont fait agir ces agents sur des huiles végétales variées, ont observé la formation d'acides gras, de glycérol, mesuré la vitesse de saponification, étudié les conditions physico-chimiques du phénomène, etc. ; mais se sont placés ainsi, dès le début, en dehors des conditions même de la germination. Ils trouvent, par exemple, le glycérol dans les produits de la saponification, alors que ce produit n'est pas encore décelé dans les graines oléagineuses en voie de germination. Ils ne se sont pas, non plus, préoccupés du milieu naturel où s'accomplissait la saponification, pas plus que de la destinée ultérieure des produits formés. Ces produits sont dans la graine germée en voie de transformation active et il serait intéressant d'essayer de caractériser quelques formes de ces produits de transformation.

A ce deuxième groupe, on peut rattacher les travaux de Pelouze (1855), Maillot (1883), Green (1890), Siegmund (1890), Connstein, Hoyer, Wartenberg (1902), Nicloux (1906). Leurs résultats, ceux de M. Nicloux surtout consistent :

1° En la découverte de l'agent saponifiant qui n'a pu d'ailleurs être isolé, son action le classe parmi les dias-

tases, alors que certaines de ses propriétés l'éloignent des diastases connues jusqu'à ce jour.

2° En ce fait que l'action lipolytique ne s'opère qu'en milieu acide, tandis que les lipodiasases d'origine animale exercent leur action dans un milieu d'une certaine alcalinité.

Ces recherches n'ont envisagé que le côté purement organique des phénomènes chimiques réalisés, elles se sont tenues en dehors du milieu minéralisé naturel que représente une graine en germination. Or, l'importance des composés minéraux dans des réactions chimiques de la nature de celles qui s'effectuent dans les phénomènes germinatifs, est considérable. Les phénomènes de saponification sont sous la dépendance des acides ou des bases, les phénomènes d'aldolisation qui interviennent dans la synthèse des sucres sont sous les mêmes influences. Les travaux de G. Bertrand sur la laccase ont établi l'influence primordiale de certains éléments chimiques dans les phénomènes diastasiques ; d'autres plus récents comme ceux de M. Canals sur la sucrase en témoignent également. Or, si les chimistes précédents ont étudié, parfois, l'influence de composés minéraux sur la saponification (influence des acides en particulier), il n'a été envisagé pour aucun de ces composés s'il existait ou non dans la graine germée. Seul, le gaz carbonique qui, évidemment, se rencontre dans les germinations, a été envisagé à ce point de vue par Nicloux. En définitive, les travaux indiqués n'ont pas été effectués dans les conditions serrant de près celles du travail germinatif.

En résumé, si l'on veut marquer nettement les résultats acquis à ce jour sur la transformation des matières grasses et plus spécialement sur leur saponification au cours de la germination des graines, il faut se borner aux points suivants :

a) La saponification des glycérides se produit au cours de la germination ; les acides gras ont été décelés, le glycérol ne l'est pas encore.

b) Les facteurs de la saponification sont bien connus, semble-t-il, dans les graines : présence d'une part d'une

diastase (lipase), d'autre part, d'un milieu acide. Or, si l'intervention d'une lipase est un fait démontré au moins pour la graine de ricin, cette lipase n'a jamais été isolée; aucun auteur non plus ne s'est préoccupé jusqu'à présent d'établir avec quelque précision l'origine et la composition du milieu acide nécessaire, réalisé dans la graine germée. Seul M. Nicloux, ainsi que je l'ai indiqué précédemment, a désigné l'acide carbonique comme le corps essentiel déterminant l'acidité. L'étude du milieu minéralisé naturel où s'accomplit la saponification, la vérification de l'influence d'un tel milieu, la part respective de ses constituants dans le phénomène lipolytique, la façon dont l'agent diastasique agit pour catalyser la réaction, font l'objet d'une partie importante de mes recherches.

c) Les acides gras et la glycérine sont utilisés par la graine pour effectuer la synthèse des hydrates de carbone, mais aucune preuve directe autre que la disparition des réserves grasses et l'apparition concomitante des glucides n'a été fournie du phénomène. En particulier, les termes intermédiaires qui doivent conduire des acides gras aux sucres sont inconnus (1). La transformation des glycérides ne peut être que le résultat d'oxydations produites sur leur chaîne carbonée, la rupture consécutive de ces chaînes déterminant l'apparition de composés plus simples qui participeront à la synthèse des sucres. L'oxydation porte-t-elle sur les glycérides ou sur les acides gras, autrement dit précède-t-elle ou suit-elle la saponification ? J'ai étudié ce premier point qui n'avait pas été jusqu'alors examiné.

Quels sont les premiers composés soumis à cette oxydation : acides saturés ou acides non saturés ? Quels sont les produits initiaux résultants. Très peu de faits sont connus sur ces phénomènes. Ivanow a trouvé au cours de la germination de la graine de lin un abaissement notable de la valeur de l'indice d'Iode, il indiquerait

(1) Certains auteurs inclinent seulement à admettre que le saccharose représenterait le premier hydrate de carbone apparaissant au cours de la germination, sans preuves bien convaincantes d'ailleurs.

l'apparition d'acides saturés ; Miller, dans la germination de la graine d'Hélianthus a observé une augmentation de l'indice de saponification, laquelle dénoterait un abaissement du poids moléculaire moyen des acides gras, par suite, une dégradation de leur molécule. Ce sont là des résultats dont l'interprétation reste bien difficile. J'ai tenté d'apporter par des observations plus précises quelque lumière sur ces points épineux.

d) Enfin les données acquises au cours de l'étude de l'oxydation des huiles siccatives prouvent la formation de corps peroxygénés (glycérides peroxydés), puis leur destruction sous forme de composés aldéhydiques, acides, etc. Ces composés, les aldéhydes surtout, dont l'importance ne peut échapper si on se rappelle la constitution des glucides, n'avaient pas été recherchés encore dans les graines oléagineuses germées ; j'ai pu les mettre en évidence.

Ainsi les recherches que j'ai entreprises m'ont conduit à faire :

1° Etude des matières grasses de la graine et des germinations : variations quantitatives, production des acides gras. En possession de ce matériel d'étude peu facile à obtenir et surtout à conserver, j'ai également tenté de connaître comment se faisait dans la germination l'utilisation des acides gras, quels étaient les premiers employés, en quoi consistaient les termes chimiques obtenus au début de leur dégradation. Ce travail a été effectué en recherchant les variations du poids moléculaire moyen des acides gras au cours de la germination. C'est en somme une introduction à l'étude du problème capital et si peu connu encore de la transformation des matières grasses en hydrates de carbone dans les graines oléagineuses, problème que je n'ai pas abordé.

2° Etude détaillée des substances minérales de la graine et des germinations : nature, localisation, formes chimiques et leurs variations. Cette recherche fut entreprise par des procédés divers : analyse chimique et spectrographique, analyse histo-chimique, afin de pouvoir établir d'une façon suffisamment précise les proportions

et par suite, la concentration des substances minérales, leur nature, leur localisation.

3° Etude de l'influence des composés minéraux essentiels de la graine sur la saponification.

J'ai choisi comme sujet d'étude la graine de Soleil (*Hélianthus annuus*), cette graine ayant fait l'objet au point de vue exclusif des matières grasses, d'un travail fort complet de Jameson et Baughmann pouvant fournir des points d'appui solides pour les discussions ultérieures.

Ce travail a été effectué dans divers laboratoires de la Faculté des Sciences de Lyon.

Je dois remercier ici tout d'abord M. Couturier, professeur de chimie agricole à l'Université de Lyon, qui l'a accueilli avec une bienveillance dont je lui suis infiniment obligé. Ma reconnaissance ira aussi à MM. Grignard, professeur de chimie générale, Meunier, professeur de chimie industrielle, Job, professeur de chimie physique, Policard et Noël, professeurs agrégés à la Faculté de Médecine, qui ont grandement facilité ces recherches par leur appui moral et matériel, à M. M. Lemarchand, professeur de chimie industrielle, dont l'amitié fraternelle m'a constamment soutenu, aidé et encouragé.

Je n'oublierai pas ici MM. Molliard, Professeur à la Sorbonne, Combes, Guilliermond, Javillier, Maîtres de Conférences à la Faculté des Sciences de Paris, dont les conseils autorisés me furent précieux.

C'est un devoir aussi pour moi de rappeler l'aide que m'a donnée le Comité de la Caisse des Recherches Scientifiques, par les subventions successives qu'il m'a attribuées, elles m'ont permis de mener à bonne fin un travail minutieux demandant à la fois des appareils précis, des réactifs nombreux et coûteux.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DES MATIÈRES GRASSES DE LA GRAINE DE SOLEIL

(*Hélianthus annuus*)

Recherches sur leur évolution pendant la germination

I. INTRODUCTION

L'étude chimique de la graine de Soleil a été faite surtout au point de vue proportion et composition de ses matières grasses. Le fait s'explique facilement, étant donnée l'importance commerciale assez grande de l'huile de Soleil. La Russie, la Hongrie, les pays de l'Orient l'utilisent au point de vue alimentaire comme substitut du beurre, au point de vue industriel dans la fabrication des savons et des vernis. Un dernier usage de ces graines se trouve dans l'alimentation des oiseaux de basse-cour. L'exploitation industrielle de l'huile extraite a été tentée aux Etats-Unis ; en 1925, la récolte des graines dans les états du Missouri, de la Californie, de l'Illinois s'est élevée à 6.500.000 pounds, mais leur prix trop élevé ne permet pas à l'huile obtenue de lutter contre les autres huiles végétales : arachide, coton, etc.

La composition de l'huile de Soleil, au sujet de laquelle Lewkowitsch, dans son traité classique, donne quelques indications, a été étudiée récemment par G.-S. Jameson et W.-F. Baughmann. L'huile obtenue est de couleur

jaune pâle, son goût est doux, son odeur agréable. C'est une huile siccative. Elle contient :

Glycérides d'acides non saturés	90,9 0/0
(acide linoléique, acide oléique), dont	
57,5 0/0 de linoléide, 34,4 0/0 d'oléide).	
Glycérides d'acides saturés	6,6 —
Matières non saponifiables	1,2 —
Si on rapporte aux acides seuls :	
Acides non saturés	86,1 —
Acides saturés	7,1 —

Les acides non saturés sont l'acide oléique : $C^{17}H^{33}CO^2H$, l'acide linoléique : $C^{17}H^{31}CO^2H$.

Les acides saturés sont : l'acide palmitique : $C^{15}H^{31}CO^2H$, l'acide stéarique : $C^{17}H^{35}CO^2H$, l'acide arachidique : $C^{19}H^{39}CO^2H$, l'acide lignocérique : $C^{23}H^{47}CO^2H$.

II. PROPORTION DES MATIÈRES GRASSES A DIFFÉRENTS MOMENTS DE L'ÉVOLUTION DE LA GRAINE

a) **Extraction**

Graine non germée

L'extraction des matières grasses a été faite soit sur des graines dépourvues de leur péricarpe, soit sur des graines non décortiquées. Dans les deux cas, les graines ont été soumises à un broyage préalable, puis épuisées à l'éther dans un appareil Soxhlet. L'épuisement réalisé est rapide et complet ; les pertes en éther sont minimales grâce à un réfrigérant ascendant.

Germinations

Les graines ont été mises à germer dans une étuve maintenue à 25°, la germination s'effectuant à l'abri de la lumière. Dès que le degré de germination voulu était atteint, degré mesuré par la longueur de l'axe hypocotylé, les graines étaient placées dans l'éther. D'autres graines germées, témoins, furent desséchées dans l'étuve à 80°, ou dans une cloche à vide (le vide atteignait 6 mm.) en présence d'acide sulfurique, jusqu'à poids constant. Le poids sec était ainsi obtenu.

L'extraction des matières grasses fut faite également au Soxhlet. Dans les deux cas précités, l'huile extraite fut desséchée dans l'étuve à 110°, et dans le vide.

b) **Réserves grasses de la graine non germée**

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

	LOT N° 1	LOT N° 2	LOT N° 3	LOT N° 4
Poids sec des graines avec péricarpe (akènes).	90g47	98g	36g	325g50
Poids de l'huile ex- traite.	25g65	29g60	19g66	93g83
Pourcentage vis à vis du poids des akènes.	28,35 %	30,2 %	28,92 %	28,87 %
Pourcentage (1) vis à vis du poids des graines.	54,59 %	58 %	54,65 %	55,45 %

En moyenne, la teneur en huile est 29,08 0/0 du poids de l'akène ; 55,67 0/0 du poids de la graine sèche.

L'huile contenue dans les graines de Soleil que j'ai étudiées, a les caractères indiqués précédemment, les résultats quantitatifs sont comparables à ceux de Jameson et Baughmann qui indiquent une teneur variant de 27 à 30 0/0 du poids de l'akène.

c) Réserves grasses de la graine germée

Les teneurs des graines germées en huile sont données par le tableau page 15, le stade de germination est défini par la longueur des hypocotyles en mm., c'est-à-dire de l'axe allant du point d'attache des cotylédons à l'extrémité de la racine de la plantule.

d) Résumé des résultats obtenus. Conclusions

Les résultats obtenus dans l'étude des matières grasses de la graine d'Hélianthus et de sa germination peuvent

(1) Le poids des graines d'après des observations faites sur des lots décortiqués est les 52 % du poids des akènes.

	LOT N° 1			LOT N° 2					LOT N° 3			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Longueur des hypoco- tyles en millimètres..	5 à 6	10 à 11	16 à 17	5	8 à 9	16 à 18	35 à 40	55	10	20	40 à 50	75 à 80
Nombre de graines germées.....	150	55	40	115	115	115	140	50	150	150	140	125
Poids sec des graines...	7:52	2:759	2:02	5:788	5:640	5:800	6:31	2:51	7:071	6:6	6:958	6:250
Poids sec de l'huile.....	3:687	1:244	0:713	2:823	2:517	2:168	2:05	0:60	3:12	2:382	1:827	0:749
Pourcentage en huile...	49,03	45,23	35,03	48,77	45,17	37,38	32,50	27,88	44,13	36,09	26,40	12,04

facilement se lire sur le graphique (fig. 1). Ils se résument ainsi : La quantité de réserves grasses diminue très rapidement au début de la germination ; cette diminution suit ensuite, une marche moins rapide mais régulière.

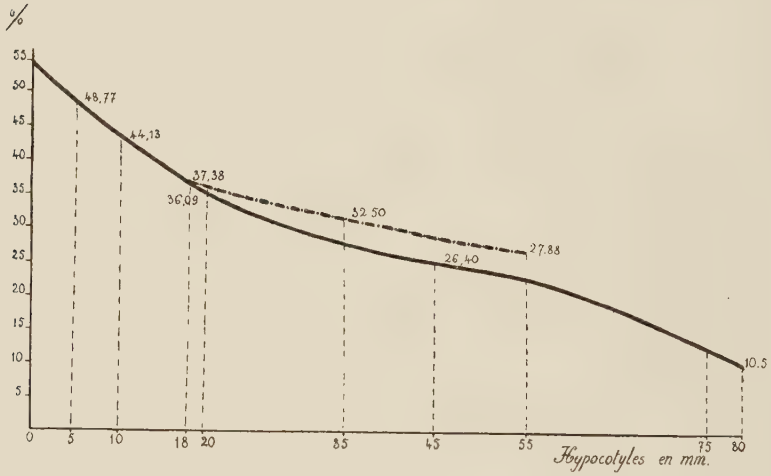


FIG. 1

III. ÉTUDE DU POIDS MOLÉCULAIRE MOYEN DES ACIDES GRAS A DIFFÉRENTS STADES DE L'ÉVOLUTION DE LA GRAINE

Le poids moléculaire moyen des acides gras est intéressant à déterminer ; il permettra, en effet, si l'on peut suivre ses variations au cours de la germination, de savoir :

1° s'il y a destruction primitive des glycérides par oxydation par exemple, ou au contraire, saponification d'abord de ces glycérides ;

2° d'étudier les transformations de la molécule des acides gras libérés ; de connaître l'ordre de leur disparition.

La détermination de ce poids moléculaire moyen peut se faire, évidemment, par l'analyse chimique ; en établissant les proportions des différents acides gras contenus dans l'huile extraite, on peut le calculer facilement. Mais un pareil travail est considérable étant donnée, d'une part, la complexité de constitution de l'huile d'Hélianthus et la masse très grande d'huile à obtenir dans chaque extraction, pour chaque étape germinative, afin d'avoir des quantités suffisantes des divers acides gras présents. Une semblable analyse a été faite sur l'huile des graines non germées par Jameson et Baughmann, le poids moléculaire moyen calculé d'après les résultats de cette analyse atteint 290,7.

J'ai utilisé pour cette détermination la méthode tonométrique qui, en premier lieu, est extrêmement rapide et conduit d'autre part, à des résultats d'une exactitude véritablement satisfaisante.

a) Technique

La détermination demande d'abord la préparation des acides gras, pour cela on détermine la saponification des graisses par la potasse alcoolique à 4 0/0. Un poids de 10 grammes d'huile est ainsi saponifié dans un Erlen-

meyer chauffé au bain-marie et muni d'un réfrigérant ascendant. L'opération est complètement terminée au bout d'une heure et demie ; l'alcool est chassé par évaporation, les savons obtenus sont dissous dans l'eau, les matières non saponifiables le sont par l'éther ; la séparation des deux solutions se fait par l'emploi d'un tube à Brome. La solution des savons est ensuite décomposée par l'acide sulfurique dilué, les acides gras libérés se rassemblent en surface. Par des lavages successifs à l'eau distillée chaude, ces acides sont débarrassés de leurs impuretés, puis desséchés dans le vide. Le mélange d'acides obtenu est de couleur jaune clair, transparent ; dès la température de 13-14°, il devient visqueux.

b) Détermination du poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire moyen des acides a été faite par l'appareil tonométrique de Menzies (1). Le principe de la méthode est le suivant : une molécule-gramme d'une substance dissoute dans l'éther donne un abaissement de pression de 1.577 mm. Appelons P le poids en grammes de composé dissous dans v cm³ d'éther, si nous ramenons au poids susceptible de se dissoudre dans un litre d'éther, ce dernier sera :

$\frac{P}{v} \times 1.000$. Le nombre n de molécules-grammes correspondant sera, si M est le poids moléculaire du composé :

$$n = \frac{P}{v} \times \frac{1.000}{M}.$$

L'abaissement moléculaire étant 1.577, pour n molécules, l'abaissement constaté sera $a = n \times 1.577$.

$$a = \frac{P}{v} \times \frac{1.000}{M} \times 1.577 \quad \text{d'où :}$$

$$M = \frac{P}{v} \times \frac{1.000}{a} \times 1.577$$

P : poids du composé introduit.

v : volume d'éther ayant servi de dissolvant.

a : abaissement constaté en mm.

M : poids moléculaire cherché.

(1) MENZIES : *J. of the Am. Chem. Soc.*, 1909, p. 1615.

c) Appareil de Menzies

L'appareil utilisé est le tonomètre de Menzies (fig. 2). Je le décrirai ici, ainsi que sa manipulation pratique, étant donnés les bons renseignements que cet appareil peut fournir dans les recherches de chimie physiologique.

L'appareil est constitué :

1° d'un ballon B dit « jacket » dans lequel on place l'éther pur et anhydre (éther deshydraté au sodium et

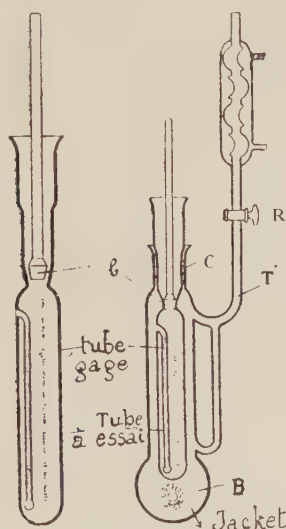


FIG. 2

distillé). Ce ballon est muni d'un dispositif réfrigérant R qui permet, après condensation des vapeurs d'éther, le retour du solvant pur dans le jacket. Un robinet permet l'ouverture et la fermeture du réfrigérant.

2° Un tube à essai de construction spéciale peut rentrer dans le jacket et fermer exactement le col C de ce dernier. Ce tube à essai renferme intérieurement un tube de section très fine : le tube-gage, soudé à la paroi supérieure du tube à essai. L'ouverture du tube-gage se fait en somme dans l'espace compris entre le tube à essai et le jacket. L'extrémité inférieure du tube-gage est per-

forée de trous, une communication est ainsi établie entre les deux tubes. Le tube à essai enfin, peut être fermé hermétiquement par un bouchon à l'émeri *b*, muni d'un manche de verre. Une graduation en mm. existe sur le tube-gage, une graduation en cm³ est portée sur le tube à essai.

d) **Opération**

L'opération est assez minutieuse.

Elle exige que l'opérateur se conforme très exactement aux indications suivantes données par Menzies ou tirées de mes propres observations.

L'éther est placé dans le jacket de façon à remplir environ les trois-quarts de sa partie sphérique. Il est soumis ensuite à une ébullition assez prolongée, l'appareil de chauffage étant constitué par des lampes à incandescence. Il est nécessaire de favoriser l'ébullition par l'introduction de quelques menus fragments de quartz par exemple, il faut éviter absolument la surchauffe des vapeurs d'éther située au-dessus du liquide en interposant un écran de carton d'amiante entre le ballon et le foyer. L'ébullition doit se produire 10 à 15 minutes, le bouchon du tube à essai étant enlevé, le robinet du réfrigérant étant ouvert. On verse ensuite aussi rapidement que possible 30 à 35 cm. d'éther provenant du jacket dans le tube à essai, puis ce dernier est remis immédiatement en place. L'ébullition est encore poursuivie dans les mêmes conditions, 1 minute ; on ferme alors le robinet du réfrigérant. La vapeur d'éther n'a, à ce moment, plus d'autre issue que celle du tube-gage, elle y passe donc, va dans l'intérieur du tube à essai dont elle élimine progressivement l'air. L'opération est prolongée 3 minutes en maintenant toujours l'ébullition. Ensuite le bouchon du tube à essai est approché et maintenu dans l'ouverture du tube de telle façon que les vapeurs d'éther qui s'échappent et se condensent à l'air ne retombent plus dans le tube, mais forment en se liquéfiant un manchon liquide entre le bouchon et le tube. Lorsque la quantité d'éther condensée à la surface supérieure du

bouchon émeri est suffisante pour assurer une fermeture hermétique (1) (c'est un point très important), le bouchon est descendu rapidement à sa place normale, le robinet du réfrigérant est ouvert. Si l'opération a été mal conduite, une partie du liquide passera à ce moment du tube à essai dans le jacket.

Sinon l'éther descend lentement dans le tube-gage. Comme le jacket et le tube-gage renferment tous deux de l'éther pur, la hauteur des liquides devrait être la même dans le tube-gage et le tube à essai, en réalité la capillarité détermine une légère dépression dans le second par l'action des tensions superficielles. Cette différence, qui doit rester sensiblement constante au cours des diverses expériences réalisées, doit être notée.

La première partie de l'opération est terminée, la mesure véritable du poids moléculaire commence alors. Au moyen d'un papier buvard, on enlève l'éther qui surmonte le bouchon émeri du tube à essai, puis le bouchon lui-même.

A ce moment, quelques gouttes d'acide gras sont introduites dans le tube à essai au moyen d'un tube effilé recourbé à son extrémité ; le tube est légèrement chauffé pour rendre les acides gras liquides, la pesée du tube contenant les acides, faite avant et après l'opération, donne la mesure du poids des acides introduits. Le robinet du réfrigérant est fermé à cet instant pour déterminer le barbotage de l'éther dans le tube à essai assurant ainsi à la fois, une bonne dissolution des acides, l'égalisation des températures du jacket et du tube à essai, l'élimination complète de l'air de ce dernier. 5 minutes de barbotage sont suffisantes. La suite de l'opération est menée comme dans la première partie avec les mêmes précautions lors de la fermeture du tube à essai. L'introduction des acides gras détermine une diminution de tension par rapport à celle de l'éther pur. Peu à peu, une dénivellation se produit dans le tube-gage. Pendant l'éta-

(1) Une bonne précaution consiste à verser immédiatement après la fermeture, un peu d'éther sur la surface du bouchon pour compléter la fermeture.

blissement de cette dépression, il est essentiel de remuer vigoureusement l'appareil toutes les demi-minutes au moins, cela pendant 10 minutes, de façon à atteindre l'état véritable d'équilibre. Celui-ci une fois obtenu, se conserve quelle que soit l'agitation ou le temps. La dénivellation sera lue sur l'échelle graduée du tube-gage par rapport au niveau primitif. Le volume d'éther dans lequel on a solubilisé les acides est noté sur la graduation du tube à essai, la lecture dans les opérations faites est facile car les dénivellations sont rapidement élevées. Il est évident que si la dépression a une ampleur telle que le liquide s'abaisse en-dessous du zéro du tube-gage, l'opération est à recommencer, la quantité d'acide mise en dissolution est trop forte.

e) Résultats

Graines non germées

	Poids d'acide P	Dénivellation		Volume d'éther v	Poids moléculaire $M = \frac{P}{v} \times \frac{100}{a} \times 1577$
		Capillaire	Tonique		
		a			
	gr.	cm.	cm.	cm ³	
1 ^{re} expérience	0.100	0,3	1,48	29,5	300
2 ^e expérience.	0.566	0,45	7,35	39,7	288
3 ^e expérience.	0.526	0,45	6,35	42,2	289

La moyenne arithmétique des résultats précédents donne comme valeur du poids moléculaire moyen, des acides gras de la graine non germée : 292.

Ce chiffre peut être considéré comme exact avec une erreur possible de 3 0/0. L'erreur ΔPM produite sur le poids moléculaire cherché est en effet :

$$\frac{\Delta PM}{PM} = \frac{\Delta P}{P} + \frac{\Delta v}{v} + \frac{\Delta a}{a}$$

L'erreur relative sur le poids P des acides gras, pesé avec une balance de précision, est au plus 1/500, l'erreur

de lecture sur le volume v d'éther est au plus d'une 1/2 division, la moyenne du nombre des divisions lues étant 30, $\frac{\Delta v}{v} = \frac{1/2}{30} = \frac{1}{60}$. L'erreur commise lors de la lecture de a , valeur de la dénivellation, est au plus d'une division, sur un nombre moyen de 75 divisions lues :

$$\text{Par suite : } \frac{\Delta PM}{PM} = \frac{1}{500} + \frac{1}{60} + \frac{1}{75} = \frac{32}{1.000} \text{ environ } 3 \text{ 0/0.}$$

Le poids moléculaire moyen ainsi trouvé concorde d'ailleurs avec celui que l'on peut calculer par les résultats de la minutieuse analyse de Jameson et Baughman. Ce poids calculé est 290,7, on peut donc considérer la méthode tonométrique utilisée ici, comme extrêmement satisfaisante, la rapidité de l'opération en fait une méthode de choix pour les biologistes.

Germinations

La même méthode a été utilisée pour déterminer le poids moléculaire moyen des acides gras des réserves lors des phénomènes germinatifs. L'emploi de l'éther comme liquide tonométrique est précieux du fait de la précision qu'il permet d'obtenir avec des poids minimes de substance (1).

Les résultats numériques sont les suivants (voir aussi fig. 3) :

GERMINATIONS Hypocotyles	Dénivellation totale a	Volume d'éther v	Poids d'acide gras p	Poids moléculaire
10mm	25mm6	35cm34	0g1871	292
20mm	25mm4	40cm3	0g1841	285
35-40mm	23mm	30cm3	0g136	310
75-80mm	24mm5	33cm3	0g1809	353

(1) L'éther offre aussi des inconvénients : surchauffe extrêmement facile de l'appareil que l'on doit éviter à tout prix sans risque d'explosion. Un accident de cette nature m'a privé dans une de mes recherches de tonomètre, le temps demandé par la réparation de l'appareil a été suffisant pour permettre aux acides gras de s'oxyder et empêcher toute détermination exacte.

La dénivellation capillaire est restée constante dans toutes ces expériences (3 mm.).

En résumé :

Le poids moléculaire moyen des acides gras reste sensiblement constant et égal au poids moléculaire moyen des acides gras correspondant aux glycérides de la graine

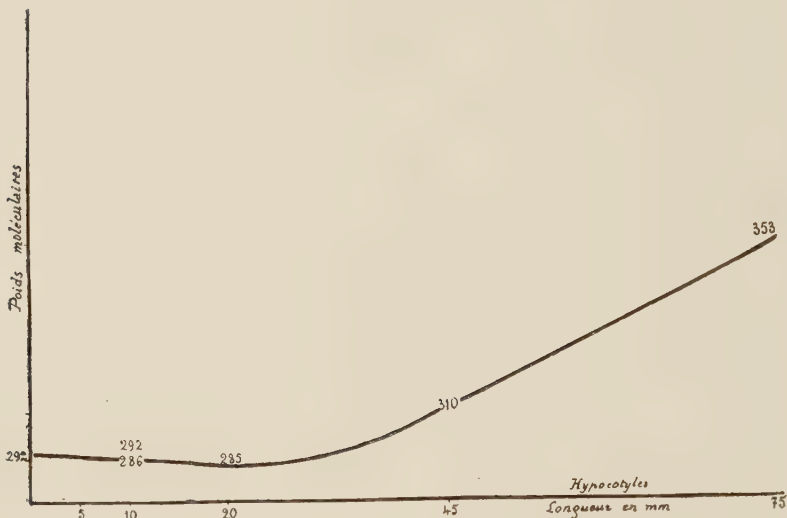


FIG. 3

non germée, cela pendant une assez longue période des phénomènes germinatifs (fig. 3). Mais ce poids moléculaire se relève progressivement et sensiblement dans les derniers stades du phénomène.

IV. ÉTUDE DE LA VALEUR DE L'INDICE D'ACIDES GRAS LIBRES A DIFFÉRENTS STADES DE L'ÉVOLUTION DE LA GRAINE

Technique

La détermination de l'indice d'acides gras libres a une valeur physiologique et chimique, car la comparaison des valeurs obtenues pour cet indice dans la graine non germée et dans les germinations, permet de conclure à la saponification ou non des glycérides.

L'indice d'acides gras est représenté habituellement par le nombre de mmgr. de potasse, nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans un gramme d'huile. Sa détermination est menée de la façon suivante: dissolution d'un poids déterminé d'huile dans l'alcool éthéré, titrage par la soude de titre $\frac{N}{5}$ avec la phénolphtaléine comme indicateur. La solution de soude utilisée renfermait 8 mmgr. par cm^3 , le nombre de mmgr. de potasse est évidemment n mmgr. de soude $\times \frac{\text{KOH}}{\text{NaOH}}$ c'est-à-dire $n \times 1,4$.

Graines non germées

Quatre opérations ont été effectuées, portant respectivement sur 6 gr. 014, 5 gr., 2 gr. 011, 2 gr. de graisses; les indices obtenus furent: 2,11, 2,90, 2,22, 3.

La moyenne est 2,55, l'indice est très faible, caractère rencontré, d'ailleurs, dans l'huile extraite de la plupart des graines oléagineuses.

Germinations

Le tableau ci-après résume les données et les résultats:

		Longueur des Hypocotyles	Valeur de l'indice
1 ^{re} série.....	Exp. 1	5 à 6mm	3,08
	Exp. 2	10 à 11mm	8,6
2 ^e série.....	Exp. 1	5mm	4,28
	Exp. 2	8 à 9mm	8,75
	Exp. 3	35 à 40mm	15,12
	Exp. 4	55mm	18,34
3 ^e série.....	Exp. 1	10mm	8,7
	Exp. 2	20mm	13,3
	Exp. 3	40-50mm	13,2
	Exp. 4	75-80mm	17,2

Le graphique (fig. 4) met les résultats en évidence.

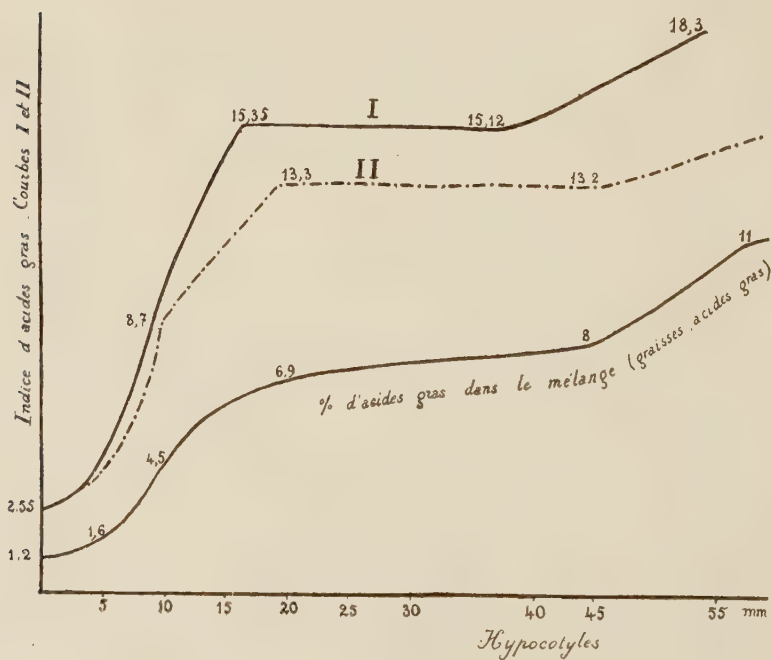


FIG. 4

Résultats

La teneur en acides gras libres est extrêmement faible au début de la germination ; elle acquiert assez rapidement une valeur notable, puis se maintient pendant une longue période à une valeur presque constante, ce n'est qu'à la fin de la germination que cette teneur se relève (1).

(1) Schmidt qui a étudié ces teneurs dans la graine d'Hélianthus aussi a trouvé comme valeur 1,6 pour la graine, 4,6 pour les hypocotyles de 20^{mm}, 13,8 pour ceux de 40^{mm}. Miller qui a entrepris une recherche analogue indique des résultats peu faciles à comparer à ceux de Schmidt ou aux miens, car il ne donne pas la longueur des germinations.

V. CONCLUSIONS RELATIVES A L'ÉVOLUTION DES MATIÈRES GRASSES

Les résultats acquis dans les expériences précédentes sur les réserves grasses d'*Hélianthus annuus* confirment en certains points les résultats d'autres auteurs (Schmidt, Miller), ne sont pas d'accord par contre avec certaines conclusions formulées à propos de la dislocation des réserves grasses.

a) *La teneur en matières grasses* diminue régulièrement au cours de la germination. (Observation conforme à celles de Maquenne, sur l'arachide, Leclerc du Sablon sur les amandes douces, le ricin, la noix, etc.).

b) *La transformation des matières grasses* consiste en une saponification. Cette conclusion depuis longtemps indiquée, est confirmée par l'étude du poids moléculaire moyen qui, au début de la germination, reste semblable à celui observé pour la graine non germée. Lors de cette saponification, les acides gras sont libérés ; le glycérol, si sa libération est faite, doit être utilisé dès son apparition, car il est impossible de le caractériser. J'ai essayé de le mettre en évidence par divers procédés (1) qui permettent de le déceler dans une solution sucrée, sans plus de succès que les chercheurs qui m'ont précédé.

c) *L'examen du pourcentage des acides gras libérés* au cours de la germination, indique que si la libération est un phénomène continu, parallèle à la diminution gra-

(1) Une solution contenant sucres et glycérine (si celle-ci est présente) peut s'obtenir par extraction à l'eau, d'un ensemble de germinations. 50 cm³ de cette solution sont traités par 30 cm³ d'une solution au 1/5 de carbonate de soude, puis par 5 gr. de chlorure de zinc cristallisé, le tout est amené par addition d'eau distillée à 250 cm³ et filtré. 200 cm³ du filtrat sont additionnés d'un mélange constitué par 40 cm³ d'acétate de plomb et 20 cm³ d'ammoniaque à 10 0/0. On étend ensuite à 200 cm³ au moyen d'une solution à 10 0/0 d'ammoniaque et on filtre. Le filtrat renferme la glycérine. Celle-ci peut être alors décelée par des réactions colorées : une solution de résorcine alcoolique, en présence d'acide sulfurique donne avec la solution glycérinée, une coloration rouge sang, au bout de 20 minutes si on additionne d'acide acétique glacial, la coloration vire au jaune ou à l'orange.

duelle des réserves grasses, l'utilisation des acides est également continue. Cette conclusion est valable tout au moins pour les stades germinatifs que j'ai étudiés. Si, en effet, le pourcentage des acides gras libres montre en fin de germination, une tendance à s'élever, il garde par contre une valeur sensiblement constante dans la plus grande partie du phénomène. D'autre part, cette augmentation finale de l'indice s'explique aussi par l'accroissement de la proportion dans les réserves des acides gras saturés de la graine. Ces acides peu oxydables doivent subsister longtemps, fait confirmé, comme je l'indiquerai plus loin, par l'étude du poids moléculaire moyen.

d) L'étude des *variations du poids moléculaire* moyen des acides gras permet d'affirmer que les acides gras présents au cours de la germination sont les acides des glycérides constituant de la graine. Il n'est pas possible en effet, de conclure à la présence d'acides gras de structure moins complexe que celle des acides primitifs. Si cette hypothèse était exacte, le poids moléculaire moyen des acides gras devrait s'abaisser, or c'est l'inverse que j'ai constaté.

L'augmentation de ce poids moléculaire s'explique facilement pour la graine d'Hélianthus.

L'huile de Soleil renferme : 86 0/0 d'acides non saturés : acide linoléique, acide oléique, dont les poids moléculaires sont respectivement 280, 282 ; 7 0/0 d'acides saturés : acide stéarique, acide palmitique, acide arachidique, acide lignocérique dont les poids moléculaires (284, 312, 368) sont supérieurs à ceux des acides non saturés, exception faite de l'acide palmitique.

L'augmentation finale du poids moléculaire moyen des acides gras conduit alors aux *conclusions suivantes* :

Il doit y avoir *utilisation en premier lieu des acides non saturés*, les seuls d'oxydation facile (acide linoléique, acide oléique) et aussi ceux dont le poids moléculaire est le plus faible. Les acides saturés libérés, mais non utilisés du fait de leur oxydation excessivement difficile, persistent dans leur totalité et déterminent ainsi, par suite de leur poids moléculaire élevé, la croissance observée du poids moléculaire moyen. Le phénomène coïncide

également, avec la viscosité de plus en plus accentuée du mélange d'acides gras obtenu, parallèlement avec l'avancée de la germination. Le mélange des acides gras préparés avec des germinations dont l'hypocotyle atteint 10 mm. est liquide, celui provenant de germination de 75 mm. est déjà visqueux. Or, les points de fusion des deux acides non saturés sont bas : l'acide linoléique fond à une température inférieure à -18° , le point de fusion de l'acide oléique est 14° ; les deux acides sont donc liquides à la température ordinaire. Par contre, les acides saturés sont solides à cette température : l'acide stéarique fond à 69° , l'acide arachidique à 77° , l'acide lignocérique à 81° . Plus la proportion de ces derniers acides s'élève dans le mélange, plus la viscosité s'accroît parallèlement.

VI. RECHERCHES SUR L'ÉVOLUTION ULTÉRIEURE DES ACIDES GRAS LIBÉRÉS

Les *acides gras libérés* sont, comme le prouve l'étude de l'indice d'acides gras, *immédiatement utilisés*. L'oxydation des acides gras non saturés semble le premier pas dans les phénomènes préparatoires à cette utilisation (1).

On peut le comprendre à la lumière des faits observés à propos de l'oxydation des huiles siccatives. L'étude de l'oxydation de ces huiles a été assez poussée, leur pouvoir siccatif étant dû en effet à leur oxydation. Cette oxydation, qui se produit encore plus facilement en présence de l'eau, peut donner quelque idée sur le mécanisme chimique de la transformation des acides gras dans la graine d'Hélianthus, l'huile de Soleil étant siccative. L'acide linoléique de l'huile de Soleil est un acide non saturé comme les acides constituants des glycérides des huiles siccatives, il présente 2 liaisons éthylniques:



L'acide oléique n'a qu'une seule liaison éthylnique. Les auteurs qui ont étudié les huiles siccatives (Wegert, Lippert, Gardner, Jorissen, Ingle, etc.), sont arrivés théoriquement et pratiquement aux conclusions suivantes :

a) Les huiles s'oxydent par fixation d'oxygène sur les doubles liaisons des acides.

b) Les peroxydes obtenus se décomposent avec production d'aldéhydes, de gaz carbonique, etc.

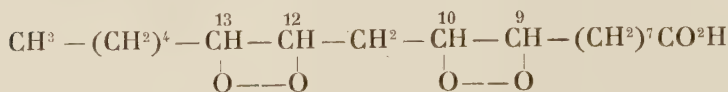
c) L'oxydation est activée par la présence des sels de fer, de manganèse, jouant le rôle de catalyseurs.

L'application de ces données à l'acide linoléique, le

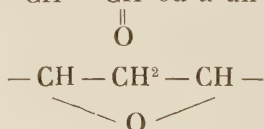
(1) Müntz avait déjà noté une oxydation limitée des acides gras au cours de la germination, l'oxydation ne dépassant pas 3 ou 4 0/0.

plus important de l'huile d'Hélianthus, donne les schémas suivants :

$\text{CH}^3 - (\text{CH}^2)^4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}^2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}^2)^7 \text{CO}^2\text{H}$
conduit par oxydation à :



La rupture de la molécule se fera entre les carbones 9 et 10, 12 et 13, libérant, d'une part, aux deux extrémités de la chaîne des composés aldéhydiques : $\text{CH}^3 - (\text{CH}^2)^4 \text{CHO}$ par exemple, ou acides contenant encore un nombre élevé d'atomes de carbone, d'autre part, au centre de la molécule, une dialdéhyde : $\text{CHO} - \text{CH}^2 - \text{CHO}$, de structure simple. L'oxydation ultérieure des fragments doit conduire dans les germinations à une combustion rapide et totale, provoquant la formation de gaz carbonique et d'eau, mais les aldéhydes formées peuvent aussi, par combinaison ultérieure avec des molécules semblables avec ou sans transformation moléculaire interne, donner des composés nouveaux : hydrates de carbone en particulier. La dialdéhyde indiquée plus haut, pourrait par exemple conduire à un cétone-alcool $-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - \text{CH}^2 - \overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{CH}}} -$ ou à un oxyde comme



La formation des composés aldéhydiques a été reconnue dans les transformations des huiles siccatives, de même la formation de corps peroxygénés (eau oxygénée, ozone, etc.).

Les hypothèses ainsi formulées sont conformes à certains résultats expérimentaux acquis au cours de mes recherches sur la graine d'Hélianthus. En premier lieu, les observations faites sur le poids moléculaire montrent, comme je l'ai signalé, qu'il n'y a pas formation d'acides gras saturés, à structure moins complexe que celle des acides primitifs libérés des glycérides. Si de pareils acides à poids moléculaire plus faible se forment,

il faut admettre que leur existence est bien fugace puisqu'ils n'influent en aucune façon sur le poids moléculaire moyen, lequel augmente au lieu de diminuer.

En second lieu, la *recherche des composés aldéhydiques* dans la graine et les germinations d'Hélianthus conduit à un *résultat positif*. Voici, en effet, les résultats obtenus sur ce point :

Si l'on fait agir le réactif de Schiff sur des coupes de graines d'Hélianthus annuus récemment cueillies, la coloration rouge caractéristique des aldéhydes est très faible, les aldéhydes ne se décèlent ainsi qu'à l'état de traces.

Si le même réactif est essayé sur des graines plus âgées, la coloration se précise notablement.

Enfin, l'étude des germinations dénote : dans les cotylédons une réaction nette, dans la plantule, une coloration également qui, sur une coupe transversale, se localise exclusivement aux vaisseaux conducteurs.

Les conclusions sont ainsi les suivantes : des *composés aldéhydiques se forment au cours des phénomènes de la germination, dans les graines oléagineuses*, ces composés se produisent déjà au niveau des cotylédons, ensuite, se rendent par les vaisseaux conducteurs aux organes de la plantule ; là, ils seront utilisés dès leur arrivée, vraisemblablement, pour de nouvelles synthèses (1).

La *recherche de composés peroxygénés* conduit également à un *résultat positif* dans les graines germées. Elle a été effectuée sur des coupes par l'iodure de potassium, la coloration brune, si elle apparaît, dénotant la mise en liberté d'iode par oxydation de l'iodure.

Cette réaction est obtenue dans les germinations, en particulier dans les vaisseaux conducteurs, également aussi dans les régions sous-épidermiques. Cette réaction permet de penser que des peroxydes sont présents. Quant à la localisation dans les vaisseaux, elle permet de croire au caractère transitoire de ces peroxydes.

(1) De pareils composés peuvent provenir aussi de la glycérine libérée, il est bien difficile de faire le partage.

En résumé, l'utilisation des acides gras de la graine de Soleil me semble pouvoir être tracée de la façon suivante :

Les acides non saturés (acide linoléique, acide oléique) de la graine d'*Hélianthus annuus* sont oxydés dès leur libération. L'oxydation détermine, d'une part, la formation de composés aldéhydiques d'existence transitoire destinés à rentrer presque aussitôt dans de nouvelles synthèses organiques, ou pouvant aussi être rapidement et complètement comburés en donnant gaz carbonique et vapeur d'eau (1). Cette destruction correspond d'ailleurs, aux remarques faites sur la valeur du quotient respiratoire des graines oléagineuses pendant la germination. Ce quotient a comme valeur 0,75, il indique la destruction des réserves grasses. Le rôle énergétique des acides gras dans la germination est évidemment de premier plan, mais les observations précédentes permettent de leur attribuer un rôle plastique non moins certain dans la synthèse des hydrates de carbone. Les composés aldéhydiques constitués, dont j'ai constaté l'existence dans les graines germées d'*Hélianthus* représentent des termes d'acheminement vers la synthèse des glucides.

(1) L'oxydation peut être facilitée dans la graine de Soleil par le fer et le manganèse dont j'ai décelé l'existence; l'importance très grande de l'action de ces métaux dans l'oxydation des huiles siccatives, a été prouvée par de nombreuses recherches (Macqey, Ingle). Or, parmi les métaux employés le fer et le manganèse se sont montrés parmi les plus actifs.

CHAPITRE II

ÉTUDE DU MILIEU MINÉRAL CONSTITUÉ PAR LA GRAINE GERMÉE

Etat chimique des éléments, localisation, proportions
à différents états de la graine

I. INTRODUCTION

Dans les études faites par les auteurs, dont j'ai signalé au début les travaux, les uns ont porté surtout sur les rapports quantitatifs existant à différentes périodes de la germination entre les réserves grasses et les matières hydrocarbonées, les autres ont étudié la saponification en elle-même, comme phénomène chimique particulier, sans tenir un compte précis du milieu naturel où elle se passait.

Or, les découvertes faites dans le domaine de la chimie, sur l'intervention des éléments minéraux au cours des réactions organiques, dans le domaine d'action des diastases également, conduisent naturellement, à envisager l'intervention de ces éléments dans les travaux chimiques de la germination. J'ai donc recherché l'intervention de ces éléments dans la saponification et, par suite, j'ai dû déterminer, avec le plus de précautions possibles, quels étaient les éléments de la graine de

Soleil, quelle était leur forme de combinaison, comment se libéraient-ils au moment de la germination, pouvaient-ils présenter à ce moment la forme active permettant l'accomplissement des réactions nécessaires à la transformation des réserves, comment étaient-ils localisés, etc. Il est évidemment obligatoire de partir de données précises si l'on veut pouvoir tirer quelques conclusions utiles.

Ainsi j'ai étudié :

1° Par l'analyse chimique et spectrographique, les éléments minéraux de la graine de Soleil.

2° Par l'analyse chimique et histochimique, sous quelle forme organique ou minérale, ces éléments se présentent dans la graine à différents états de celle-ci.

3° Par l'analyse histochimique, j'ai essayé de préciser, quand cela était possible, la localisation de ces éléments, leur migration lorsqu'elle se produit.

J'ai recherché les éléments en m'attachant surtout à la connaissance quantitative des plus abondants : phosphore, potassium, magnésium, calcium ; qualitative pour les autres. Cette étude m'a conduit à examiner les procédés d'analyse utilisés et à proposer à l'occasion quelques modifications de ces procédés.

° II. ANALYSE DES CENDRES

La graine de Soleil se trouve enfermée dans le péricarpe de l'akène, la proportion des graines seules est de 100 pour un poids de péricarpe correspondant égal à 92,7. Par suite, la proportion des graines vis-à-vis de

l'akène est : $\frac{100 \times 100}{192,7} = 51,89 \text{ 0/0}$. La teneur en eau

de chacune de ces parties a été évaluée, après un séjour de 11 heures dans l'étuve à 100°, de 1 heure dans l'étuve à 145°, les graines ont perdu 4,6 0/0 de leur poids, les péricarpes 8,22 0/0.

a) Préparation des cendres

Les graines ont été attaquées par l'acide nitrique, l'oxydation assez lente par suite d'une forte teneur en matières grasses produit d'abondants composés nitrés. L'opération dure deux jours, lorsque la matière est carbonisée, elle se détache facilement des parois de la capsule de porcelaine, où l'oxydation a été menée. On rassemble cette substance dans un creuset de platine et l'oxydation totale est terminée en chauffant avec précaution avec le chalumeau à gaz. Il est indispensable d'agir avec précaution, sinon le chauffage trop intense volatiliserait les sels de potassium. En pratique, il ne faut pas arriver à la fusion des sels obtenus ; lorsque la couleur blanche du résidu indique le départ total du charbon, la capsule est placée dans un dessiccateur à anhydride phosphorique, puis pesée au bout de 20 minutes.

100 grammes de graines ont donné 3 gr. 88 de cendres. La proportion est donc de 3,88 0/0 du poids de l'organe frais, 4,06 0/0 du poids de l'organe desséché ; elle est relativement élevée.

b) Méthode d'analyse des cendres

Les substances minérales, ou les éléments amenés à l'état minéral lors de l'oxydation de la graine, se présentent sous une forme chimique qui ne correspond pas, pour la plupart d'entre eux, à l'état véritable de ces composés dans l'organe vivant. Par l'oxydation, le phosphore, le soufre, la silice sont amenés à l'état d'acides phosphorique, sulfurique, silicique. Les métaux seront ainsi sous la forme de phosphates, de sulfates, silicates, chlorures de potassium, calcium, magnésium, fer, manganèse, si l'on s'en rapporte aux résultats trouvés pour d'autres graines que celle d'Hélianthus. Ces données permettront d'établir une méthode d'analyse qu'il est nécessaire d'exposer avant de l'utiliser, les ensembles de sels présents constituant justement des mélanges offrant de grosses difficultés analytiques. Je me contenterai, parmi ces dernières, de signaler seulement la séparation exacte du calcium et du magnésium.

Le principe de la méthode analytique suivie, après maints tâtonnements, est le suivant :

- 1° Faire une solution chlorhydrique des cendres.
- 2° Insolubiliser la silice après plusieurs traitements à l'acide chlorhydrique concentré.
- 3° Filtrer le liquide obtenu, l'amener à 100 cm³. Sur l'une des parties, A (10 cm³), doser l'acide phosphorique, sur l'autre, B (90 cm³), doser les autres éléments.
- 4° Le dosage de l'acide phosphorique sera fait à l'état de pyrophosphate de magnésie, d'après la méthode indiquée par Treadwell (1).
- 5° La solution B contient des sels de métaux (Ca, Mg, Fe, Al.), sous forme essentiellement de phosphates dans les cendres de la graine de Soleil. Il faut alors précipiter l'anhydride phosphorique préalablement, pour pouvoir doser ensuite séparément les métaux. La méthode acétoferrique sera à employer dans ce cas.

Les sels de la solution sont à l'état de phosphates

(1) TREADWELL, *Traité d'analyse quantitative*, p. 400 et suivantes.

solubles en solution acide, mais précipitent dès que la neutralisation est obtenue. On neutralise alors par l'ammoniaque jusqu'au début de trouble, puis par addition d'un excès de perchlorure de fer, on détermine la saturation de tout l'acide phosphorique. Le trouble disparaît alors, par une nouvelle neutralisation à l'ammoniaque, on le fait réapparaître. On ajoute à ce moment une solution d'acétate d'ammonium, celui-ci réagissant sur le perchlorure de fer en excès détermine la formation d'acétate de fer et de chlorure d'ammonium. L'acétate de fer dissout le phosphate, mais il s'hydrolyse très rapidement, déterminant ainsi l'apparition d'acide acétique et d'hydroxyde ferrique ; cette hydrolyse détermine par suite l'insolubilité du phosphate de fer qui précipite totalement. Le résultat : précipitation de l'acide phosphorique, est ainsi obtenu ; le point délicat de l'opération consiste en l'addition d'une quantité suffisante d'acétate d'ammonium. Ce point est atteint lorsque la solution prend une coloration brun-rouge intense, il faut arrêter alors le traitement et, par addition d'une quantité d'eau égale à la moitié du volume de solution traitée, déterminer l'hydrolyse qui sera complète à l'ébullition. L'acide phosphorique sera totalement précipité sous forme de phosphate de fer et d'alumine.

La solution filtrée contiendra le calcium, le magnésium, les métaux alcalins.

6° Le calcium sera précipité de la solution par l'addition d'un excès d'oxalate d'ammonium, sa précipitation en présence du magnésium est une des opérations les plus délicates de l'analyse minérale, c'est un problème constant dans l'analyse des cendres végétales. J'ai effectué le dosage en me basant sur les conditions indiquées par M. Lemarchands (1) pour obtenir un résultat exact. La solution sera d'abord neutralisée par l'ammoniaque, puis additionnée d'un très grand excès d'oxalate. Le précipité d'oxalate calcique obtenu est calciné au four

(1) M. LEMARCHANDS : Recherches sur l'entraînement, *Th. Sc.*, Lyon 1926.

électrique jusqu'à obtention d'une poudre parfaitement blanche, de poids constant, formée par CaO .

7° La solution provenant de la filtration de la liqueur précédente contient le Magnésium. L'excès d'oxalate d'ammonium sera décomposé après dessiccation lente de la solution, le chauffage nécessaire à la décomposition de l'oxalate sera mené prudemment à une température inférieure au rouge sombre. Le résidu est repris par l'acide chlorhydrique. Le magnésium sera précipité par le phosphate de soude. Le phosphate magnésien obtenu sera transformé par calcination en pyrophosphate. Son poids p donne le poids de magnésie contenu par la formule :
$$\frac{p \times 36,207}{100}$$

8° La liqueur filtrée contient les métaux alcalins, elle renferme aussi le chlorure d'ammonium provenant du traitement précédent. Cette liqueur est évaporée à siccité, le chlorure d'ammonium chassé par chauffage, le résidu repris par l'eau. On peut alors précipiter les sulfates par le chlorure de baryum ; s'il restait, à ce moment encore, des traces d'acide phosphorique, elles précipiteraient aussi. Dans ce cas, il faudra dissoudre le phosphate de baryum par l'acide azotique, dans lequel le sulfate est insoluble. Le sulfate resté sur le filtre est séché ; on calcine et on pèse. Le poids de sulfate fournira SO^3 .

9° La solution résultante contient toujours les sels alcalins et le chlorure de baryum ajouté précédemment. Ce baryum sera précipité par le carbonate d'ammonium, le filtrat, évaporé à sec, sera chauffé avec précaution pour chasser le chlorure d'ammonium, il reste ainsi finalement les chlorures alcalins. Le dosage du potassium sera effectué d'une manière précise et économique au moyen du tartrate acide de sodium (1). Ce sel, ajouté à la solution, détermine la formation de tartrate acide de potassium. Le précipité sera laissé au repos 24 heu-

(1) STRECKER et JUNGEK : *Bull. Soc. Chim. de France*, t. 36, p. 901, 1924.

res, puis l'excès de tartrate acide de sodium, enlevé par un lavage à l'alcool à 25 0/0, puis à 50 0/0. Lorsque 5 cm³ de la liqueur, provenant du lavage, se colorent nettement en violet par l'addition de phénolphtaléine et d'une goutte de solution décinormale de soude, le lavage est terminé. Le précipité est séché simplement à l'étuve jusqu'à poids constant. Son poids p donnera celui de

K²O par la relation simple $K^2O = \frac{p \cdot}{4}$

Le dosage du potassium peut aussi se faire sur la liqueur obtenue en épuisant longuement à l'eau chaude les cendres primitives, il faut alors séparer la silice dans la solution obtenue avant de faire le dosage.

10° Le fer et l'aluminium seront recherchés sur les cendres, après dissolution par l'eau des sels alcalins. La solution chlorhydrique des cendres est alors faite puis évaporée à siccité, le résidu soumis à une fusion alcaline avec le carbonate de potasse pur. Ce traitement transformera les acides en sels alcalins et l'acide phosphorique s'il en reste en phosphate de potassium soluble. Calcium et Magnésium seront transformés en Carbonates, le Fer et l'Aluminium en oxydes. Le culot de fusion sera repris par l'eau chaude, la partie insoluble obtenue après filtration est traitée par l'acide chlorhydrique concentré et chaud, de façon à amener le fer à l'état de sels ferriques. L'oxyde de fer et l'alumine seront ensuite précipités ensemble par addition de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque.

Le précipité séché donne le poids des deux oxydes. Le fer sera dosé par le permanganate de potassium. A cet effet, le mélange sera repris par l'acide chlorhydrique et évaporé ensuite en présence d'acide sulfurique concentré jusqu'à l'obtention de fumées blanches, afin d'éliminer tout l'acide chlorhydrique qui empêcherait le dosage. Le tout est repris par l'eau et la liqueur est réduite par l'addition de poudre de zinc. Le liquide sera filtré rapidement sur un filtre de verre poreux et le dosage du fer opéré par le permanganate et l'acide oxalique.

Le poids de l'alumine sera obtenu par différence.

Telle est la méthode que j'ai utilisée après une série d'essais ; je l'ai exposée avec quelques détails, afin de permettre l'obtention, dans des cas analogues, de résultats exacts.

c) Composition des cendres

La composition des cendres de la graine de Soleil est donnée plus loin. Elle ne préjuge en rien de l'état véritable des éléments dans la graine et peut même donner lieu à de fausses interprétations sur la teneur exacte de la graine en ces éléments. Mais l'étude de cette composition permettra d'obtenir sur ces teneurs les renseignements convenables.

Le poids des cendres analysées est 3 g. 88

1° Teneur en *silice* : SiO^2 .

Poids trouvé : 0 g. 0628.

Pourcentage : 1,62.

2° Teneur en *anhydride phosphorique* : P^2O^5 .

Poids de phosphomolybdate : 4 g. 882.

Poids d'anhydride : 1 g. 831.

Pourcentage : 47,2.

3° Teneur en *anhydride sulfurique* : SO^3 .

Poids de sulfate de baryum : 0 g. 0836.

Poids d'anhydride : 0 g. 0287.

Pourcentage : 0,74.

4° Teneur en *oxyde de potassium* : K^2O .

Poids de tartrate acide de potassium : 3 g. 816.

Poids d'oxyde : 0 g. 957.

Pourcentage : 24,60.

5° Teneur en *magnésie* : MgO .

Poids de pyrophosphate : 1 g. 233.

Poids de magnésie : 0 g. 519.

Pourcentage : 13,40.

6° Teneur en *chaux* : CaO .

Poids de chaux : 0 g. 293.

Pourcentage : 7,55.

7° Teneur en *oxyde de fer* : Fe^{O^2} .

Poids d'oxyde : 0 g. 0095.

Pourcentage : 0,24.

8° Teneur en *alumine* : Al^{O^3} .

Poids d'alumine : 0 g. 1365.

Pourcentage : 3,51.

9° Le *chlore* et le *manganèse* (1) existent, mais à l'état de traces décelables qualitativement par l'analyse microchimique. Le *zinc* non recherché par l'analyse chimique, a été décelé par l'analyse spectrographique.

En résumé, la composition des cendres de la graine d'*Hélianthus annuus* est représentée par :

Anhydride phosphorique	47,20
Potasse : K^{O}	24,60
Magnésie : MgO	13,40
Chaux : CaO	7,55
Alumine : Al^{O^3}	3,51
Silice : SiO^2	1,62
Anhydride sulfurique	0,74
Oxyde de fer	0,24
Oxydes de manganèse et de zinc	traces.
Acide chlorhydrique	traces.

Je n'ai pas dosé le sodium qui, s'il existe, est en quantité évidemment très faible, au plus 1 0/0.

d) Remarques sur l'analyse des cendres

Les résultats précédents sont le résumé d'une série d'analyses de cendres préparées généralement par le traitement à l'acide azotique. Dans une expérience, j'ai utilisé le four électrique pour la calcination et porté la température à 700°.

Les cendres ont été obtenues fondues, mais leur ana-

(1) Le manganèse peut se caractériser aussi sous forme de manganate par la fusion des cendres avec la potasse.

lyse a donné 0,51 0/0 de potasse, la volatilisation des sels de potassium a donc été, pour ainsi dire, totale ; comme le potassium est un élément essentiel des graines, l'importance de la préparation minutieuse des cendres est de premier plan. De même la séparation du calcium et du magnésium a fait l'objet de plusieurs recherches afin d'être bien sûr de la composition donnée par la concordance des résultats obtenus. Le dosage du potassium par l'emploi du bitartrate de sodium donne de bons résultats et la manipulation se révèle facile et économique (1).

(1) La méthode est exposée dans le *Bull. Soc. Chim. France* ; travaux étrangers 1924, t. 36, p. 901. Une erreur de traduction s'y est glissée. Il faut lire « le lavage est terminé quand 5 cm³ du filtrat se colorent en violet. » en place de « le lavage est terminé quand 5 cm³ du filtrat ne se colorent plus en violet. ». Le tartrate acide de sodium s'obtient en dissolvant 150 gr. d'acide tartrique et 40 gr. de soude dans l'eau.

III. PROPORTIONS RÉELLES DES ÉLÉMENTS DANS LA GRAINE DE SOLEIL

La proportion exacte des éléments minéraux dans la graine est évidemment plus intéressante que la composition des cendres, elle s'en déduit d'ailleurs facilement.

Le poids d'une graine a été évalué par la numération et la pesée de 3,188 graines séparées du péricarpe. Ces graines pèsent 194 g. 636, le poids moyen d'une graine est donc 0 g. 05277.

Le poids des cendres contenues dans une graine est donné par la formule :

$$Q = \frac{0,05277 \times 3,88}{100}, \text{ puisque le pourcentage des cendres est } 3,88.$$

Si p est le pourcentage d'un des composés des cendres (anhydride phosphorique, potasse, etc.), le poids P de ce composé dans une graine sera :

$$P = Q \times \frac{p}{100}.$$

Appelons A le poids atomique de l'élément étudié, n le nombre d'atomes de cet élément rentrant dans le composé P , M le poids moléculaire de ce composé, le poids de l'élément (phosphore, potassium, etc.) dans la graine sera donné par :

$$P \times \frac{A}{M} \times n.$$

Rapportons ce poids de l'élément au poids de la graine, nous aurons la proportion de l'élément dans la graine :

$$P \times \frac{A}{M} \times n \times \frac{1}{0,05277} = Q \times \frac{p}{100} \times \frac{A}{M} \times n \times \frac{1}{0,05277}.$$

L'expression devient en remplaçant les lettres par leur valeur :

$$\frac{0,05277 \times 3,88}{100} \times \frac{p}{100} \times \frac{A}{M} \times n \times \frac{1}{0,05277}$$

ou
$$p \times \frac{A}{M} \times \frac{n}{10.000} \times 3,88.$$

Evaluons en prenant le $\frac{1}{10.000^e}$ comme unité, la proportion exprimée en $\frac{1}{10.000^e}$ pour chaque élément sera :

$$\frac{3,88 \times p \times A \times n}{M}.$$

En appliquant la formule aux différents éléments, j'ai obtenu les résultats suivants :

PHOSPHORE

Poids atomique : 31.

Poids moléculaire de $P^2O^5 = 142$.

Proportion en $\frac{1}{10.000} = \frac{3,88 \times 47,2 \times 31 \times 2}{142} = 78.$

POTASSIUM

Poids atomique : 39.

Poids moléculaire de $K^2O = 94$.

Proportion en $\frac{1}{10.000} = \frac{3,88 \times 24,6 \times 39 \times 2}{94} = 78.$

MAGNÉSIUM

Poids atomique : 24.

Poids moléculaire de $MgO : 40$.

Proportion en $\frac{1}{10.000} : \frac{3,88 \times 13,4 \times 24}{40} = 31.$

CALCIUM

Poids atomique : 40.

Poids moléculaire de la chaux : 56.

Proportion en $\frac{1}{10.000} : \frac{3,88 \times 7,55 \times 40}{56} = 20.$

ALUMINIUM

Poids atomique : 27.

Poids moléculaire d' $Al^2O^3 : 102$.

Proportion en $\frac{1}{10.000} : \frac{3,88 \times 3,52 \times 27 \times 2}{102} = 6,6.$

SILICIUM

Poids atomique : 28.

Poids moléculaire de SiO^2 : 60.

$$\text{Proportion en } \frac{1}{10.000} : \frac{3,88 \times 1,62 \times 28}{60} = 3.$$

SOUFRE

Poids atomique : 32.

Poids moléculaire de SO^2 : 80.

$$\text{Proportion en } \frac{1}{10.000} = \frac{3,88 \times 0,74 \times 32}{80} = 1,15.$$

FER

Poids atomique : 56.

Poids moléculaire de Fe^2O^3 : 160.

$$\text{Proportion en } \frac{10.000}{1} = \frac{3,88 \times 0,24 \times 56 \times 2}{160} = 0,6.$$

Si l'on rapporte à 100 d'éléments minéraux, les proportions respectives des différents métaux et métalloïdes observés, les pourcentages suivants sont obtenus :

Phosphore	36	0/0
Potassium	36	—
Magnésium	14	—
Calcium	9	—
Aluminium	3	—
Silicium	1,5	—
Soufre	0,4	—
Fer	0,2	—

Les résultats font apparaître des différences notables avec ceux résultant de l'étude seule des composés des cendres ; le potassium en particulier acquiert une importance comparable à celle du phosphore.

IV. APPENDICE

Proportions relatives dans la graine du nombre
d'atomes des éléments présents

Il est logique de penser que dans la graine l'importance d'un élément dépend plus du nombre réel de ses atomes que de son poids absolu.

Le nombre d'atomes d'un élément considéré s'obtiendra en divisant le poids déterminé dans la graine, de cet élément, par le poids d'un atome. Ce dernier est donné par la formule $\frac{A}{6,061 \times 10^{23}}$, A poids atomique de l'élément, $6,061 \times 10^{23}$ est le nombre d'Avogadro. Ainsi le nombre N d'atomes d'un élément contenu dans un poids p_1 de cet élément est :

$$N = \frac{p_1}{\frac{A}{6,061 \times 10^{23}}} = \frac{p_1 \times 6,061 \times 10^{23}}{A}.$$

Le poids p de l'élément dans la graine est donné lui-même par l'expression établie précédemment :

$$p_1 = \frac{0,05277 \times 3,88}{100} \times \frac{p}{100} \times \frac{A}{M} \times n.$$

Par suite :

$$N = \frac{0,05277 \times 3,88 \times p}{10.000} \times \frac{A}{M} \times n \times \frac{6,061 \times 10^{23}}{A}$$

$$N = K \times 10^{19} \times \frac{p \times n}{M}$$

p pourcentage, n nombre d'atomes de l'élément dans la molécule du composé des cendres, M poids moléculaire du composé, K constante : 12,4.

En appliquant cette formule aux éléments de la graine d'Hélianthus, j'obtiens :

$$\text{Phosphore : } N = K \ 10^{19} \times \frac{47,2 \times 62}{142} = K \ 10^{19} \times 20.$$

$$\text{Magnésium : N} = \text{K } 10^{19} \times \frac{13,4 \times 24}{40} = \text{K } 10^{19} \times 8.$$

$$\text{Potassium : N} = \text{K } 10^{19} \times \frac{24,6 \times 39 \times 2}{94} = \text{K } 10^{19} \times 10.$$

$$\text{Calcium : N} = \text{K } 10^{19} \times \frac{7,55 \times 40}{56} = \text{K } 10^{19} \times 6.$$

$$\text{Aluminium : N} = \text{K } 10^{19} \times \frac{3,52 \times 27 \times 2}{102} = \text{K } 10^{19} \times 1,9.$$

$$\text{Silicium : N} = \text{K } 10^{19} \times \frac{1,62 \times 28}{60} \times \text{K } 10^{19} \times 0,7.$$

$$\text{Soufre : N} = \text{K } 1.019 \times \frac{0,74 \times 32}{90} = 1.019 \times 0,25.$$

$$\text{Fer : N} = \text{K } 1.019 \times \frac{0,24 \times 56 \times 2}{160} = \text{K } 1.019 \times 0,17.$$

Pour comparer plus facilement ces chiffres, j'ai ramené les proportions à celles de l'élément le plus faiblement représenté : le fer. Il est facile de voir que pour 170 atomes de fer, il existe :

- 170 atomes de fer.
- 250 atomes de soufre.
- 700 atomes de silicium.
- 1.900 atomes d'aluminium.
- 6.000 atomes de calcium.
- 8.000 atomes de magnésium.
- 10.000 atomes de potassium.
- 20.000 atomes de phosphore.

Cette analyse quantitative des éléments minéraux de la graine a été complétée par une étude spectrographique.

V. ANALYSE SPECTROGRAPHIQUE

L'emploi des spectres d'arc pour l'étude des cendres végétales au point de vue qualitatif est extrêmement précieux en raison d'une part de la faible quantité de matières que la méthode nécessite, d'autre part de la rapidité de l'opération et de la netteté des résultats obtenus.

a) Méthode

J'ai utilisé pour cette étude le spectrophotographe de Fery (1).

Le spectre était obtenu au moyen d'un arc éclatant entre deux charbons de 7 mm. de diamètre, le charbon positif, inférieur, étant creusé d'une petite cavité où des parcelles de cendres préalablement bien mélangées, sont placées. Le spectre de lignes, déterminé par la volatilisation des sels, est photographié (la pose est de quelques secondes), sa photographie est ensuite comparée à celles :

1° d'un spectre du carbone obtenu par les électrodes de carbone.

2° d'un spectre du fer obtenu par éclatement de l'arc entre les deux électrodes de fer. Le spectre du fer donné par le spectrographe utilisé permet de repérer les raies caractéristiques des différents éléments, lorsqu'il est gradué lui-même au préalable, par comparaison avec un spectre de fer déjà gradué. Le spectre du carbone est utilisé pour éliminer les raies que les électrodes elles-mêmes peuvent introduire du fait des impuretés qu'elles contiennent.

En faisant varier la durée de volatilisation des cendres, j'ai obtenu différents spectres et finalement la totalité des raies fournies par les métaux ou métalloïdes contenues dans les cendres (fig. 5).

(1) M. Job, professeur de Chimie physique à la Faculté des Sciences de Lyon a bien voulu m'initier à la pratique de l'appareil. Je lui présente ici mes bien vifs remerciements.

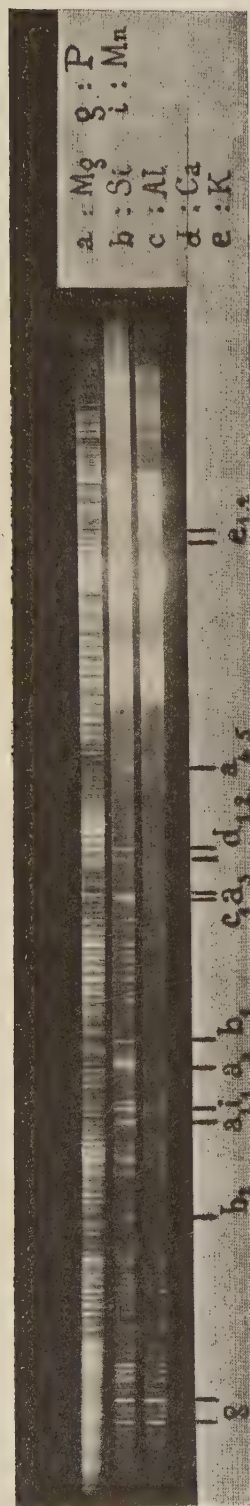


FIG. 5

Bande supérieure : Spectre du Fer.

Bande moyenne : Spectre des cendres d'Hélianthus annuus.

Bande inférieure : Spectre du Carbone.

Les planches de l'Atlas de J. Bardet permettent la comparaison des raies de ces spectres avec le spectre du fer. Un système de lunette mobile sur glissière permet facilement cette comparaison (1).

b) Résultats

Les éléments suivants ont été décelés, j'indique les raies caractéristiques observées.

Aluminium

Raies : 2.568,1 — 2.575,2 — 2.652,6 — 2.660,5 —
3.088,2 — 3.054,8 — 3.092,7.

Magnésium

Les raies fournies sont extrêmement nombreuses et précises, groupées souvent :

2.776,8	2.608,8	2.802,9
2.778,1	2.733,7	2.852,2
2.779,9	2.736,8	
2.781,5		etc.
2.783,1		

Silicium

Il a donné les raies :

2.881 et 2.507 — 2.516,2 — 2.519,3.

Calcium

Le calcium est caractérisé par :

3.159 — 3.179,5 — 3.181,3 — 3.269,4.

3.350,2 — 3.362.

Potassium

Le métal ne donne que difficilement ses raies, son abondance ici permet de reconnaître la raie 3.446.

(1) Un défaut de réglage dans l'appareil que j'ai utilisé m'a obligé de faire des agrandissements photographiques pour obtenir des résultats exacts. Les photographies du spectrographe étaient faites sur plaques Lumière ϵ , la durée de pose variant de 10 à 30 secondes.

Phosphore

Le phosphore produit nettement :

2.534,1 — 2.535,7 — 2.553,3 — 2.555,2.

Manganèse

Les raies 2.796,4 — 2.798,5 — 2.949,3 sont décelées.

Zinc

Les raies 3.018,5 — 3.302,5 — 3.456,6 sont obtenues.

Fer

Le métal donne des raies nombreuses.

Le soufre, le chlore ne sont pas décelables par cette méthode.

c) Conclusions

La méthode spectrographique m'a permis de confirmer les résultats de l'analyse chimique et aussi de voir que la graine d'Hélianthus ne contient pas d'éléments rares : Vanadium, Thallium, etc., qu'une pareille méthode permet de découvrir. Il semble qu'on puisse en conclure à la présence accidentelle de certains de ces éléments rares dans les végétaux où ils furent découverts ; ils manquent en effet, comme nous le voyons dans un organe où, s'ils étaient utiles, leur présence serait des plus nécessaire.

VI. ANALYSE HISTOCHIMIQUE DE LA GRAINE DE SOLEIL

Les méthodes précédentes m'ont permis d'établir la présence des principaux éléments de la graine de Soleil et leurs proportions, mais elles ne donnent pas d'indication sur la nature des composés dans lesquels sont présents ces éléments minéraux. L'analyse histochemique de la graine vivante pourra permettre d'élucider quelques points du problème, je l'ai faite et complétée par une analyse d'extraits aqueux dans tous les cas possibles. L'analyse histochemique peut fournir en outre des renseignements intéressants sur la localisation des éléments minéraux dans la graine, elle a été précédée d'une rapide étude histologique que je résume ici.

1° Structure histologique de la graine d'*Hélianthus annuus*

La graine de Soleil débarrassée de son péricarpe se présente avec une forme ovale, assez aplatie. La graine est constituée d'un embryon réduit, formé surtout de la radicule et de la tigelle. La gemmule fort petite est constituée de deux feuilles imbriquées. Les cotylédons bien développés représentent les 12/13 du poids total, ils sont riches en réserve, il n'y a pas d'albumen.

a) Structure de l'embryon (fig. 6, 7, et 8)

La radicule est formée d'une écorce dont le parenchyme contient des cellules polyédriques ordinaires, endoderme et péricycle sont bien visibles et distincts ; le cylindre central renferme 6 faisceaux libériens, 6 faisceaux ligneux régulièrement alternés, la moelle est assez développée.

La tigelle a une structure très nette, l'assise endodermique et le péricycle offrent en effet une forme hexago-

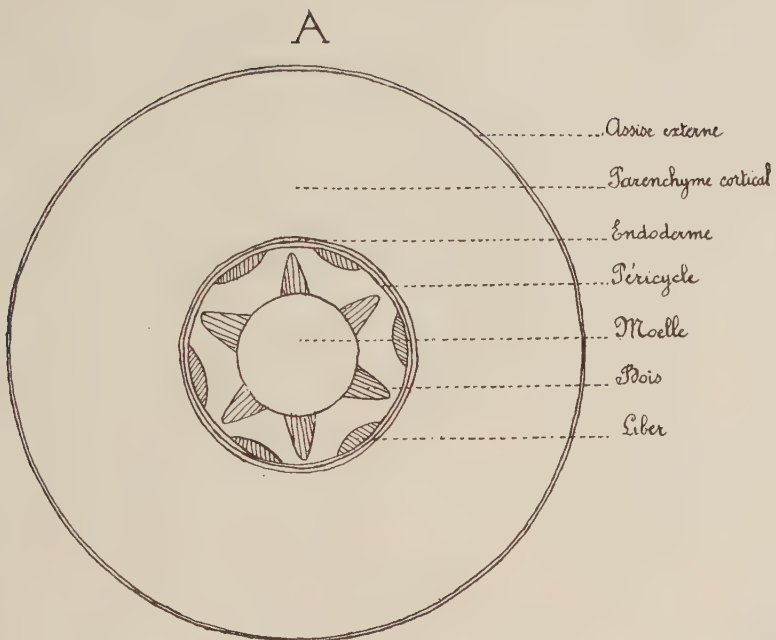


FIG. 6

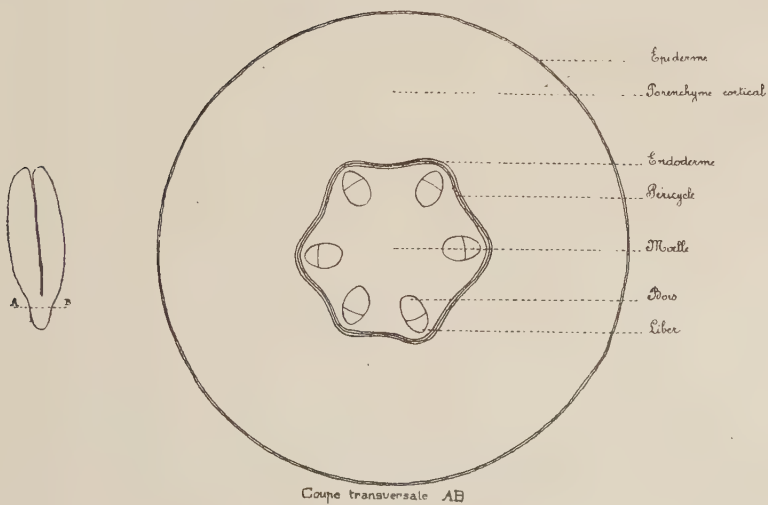


FIG. 7

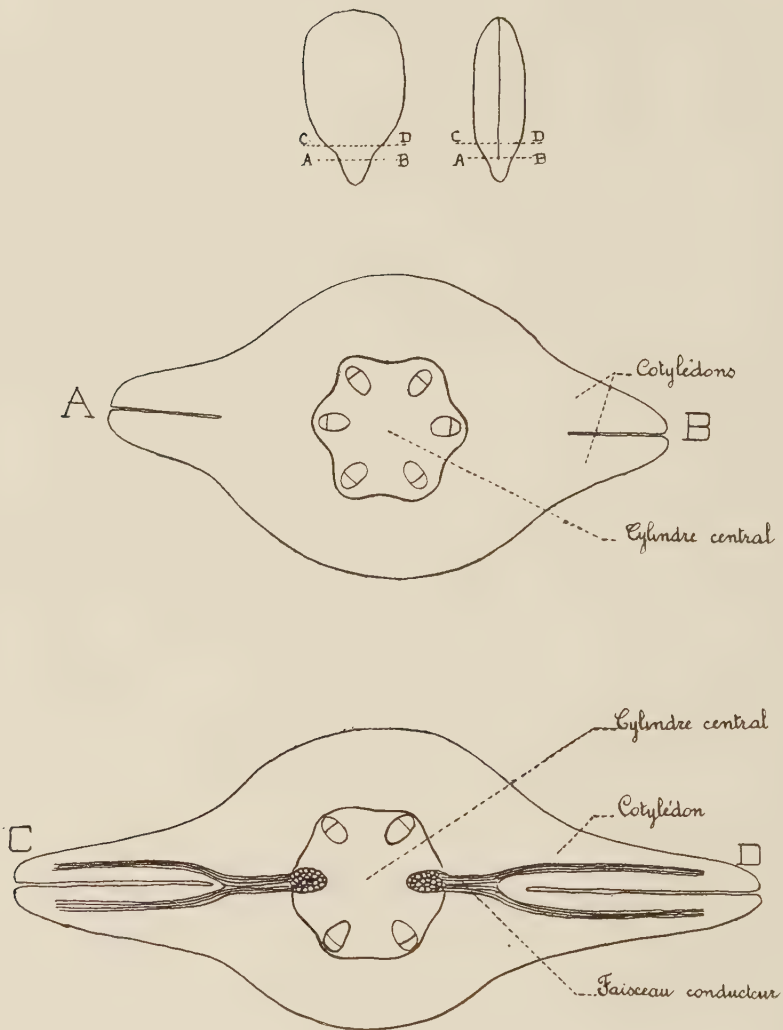


FIG. 8

nale, caractéristique. Sous l'épiderme, le parenchyme cortical formé de cellules polyédriques assez développées avec méats intercellulaires, présente une dizaine d'assises. Le cylindre central contient 6 faisceaux libéro-ligneux, la moelle est formée d'un parenchyme avec méats intercellulaires, les cellules sont arrondies. Sur des coupes pratiquées à un niveau plus élevé dans la tigelle, on observe le point de départ des faisceaux libéro-ligneux

vers les cotylédons. La gemmule présente deux feuilles très petites imbriquées, visibles facilement sur une coupe transversale faite à un niveau convenable. Sur une section longitudinale, elle a l'aspect d'un organe conique pénétrant dans l'intervalle intercotylédonaire.

b) Structure des cotylédons (fig. 9)

Une coupe transversale des cotylédons montre la succession des tissus suivants :

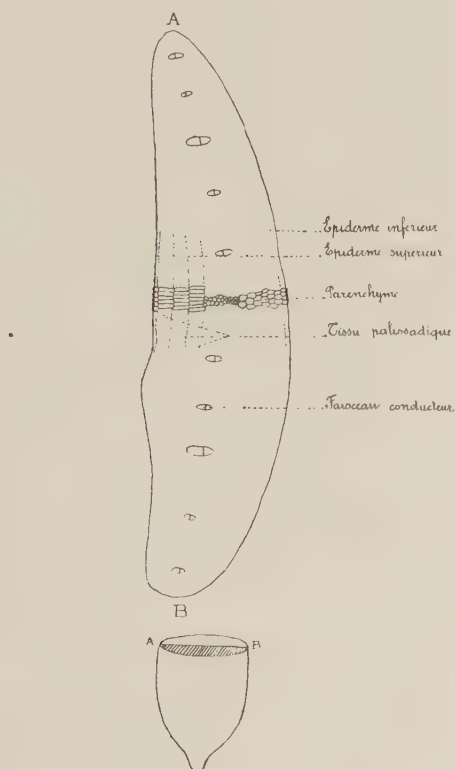


FIG. 9

1° Un épiderme inférieur ou externe avec cuticule bien développée.

2° Un parenchyme foliaire constitué de plusieurs couches cellulaires (8 à 10) avec cellules polyédriques.

3° Un parenchyme formé de cellules allongées limité finalement par l'épiderme supérieur ou interne. Des fais-

ceaux libéro-ligneux assez nombreux sont plongés dans le parenchyme foliaire.

Une coupe longitudinale médiane de la graine montre nettement les parties ci-dessus décrites : gemmule, tigelle, radicule, cotylédons. Sur cette coupe, la plantule se montre formée de cellules très régulières à section quadrangulaire en arrivant vers la base de la tigelle et dans la radicule.

2° Analyse histochimique

a) Technique

GRAINE NON GERMÉE. — Les recherches ont été faites sur des coupes pratiquées dans l'organe frais. L'épaisseur moyenne des coupes était de 15 μ . Pour obtenir la localisation des éléments dans les lieux où ils se trouvent réellement, il est nécessaire d'utiliser la quantité minimum de réactif nécessaire afin de recouvrir soit une partie déterminée de la coupe, soit la coupe entière, mais en évitant la diffusion autour de l'organe. L'emploi de pipettes très effilées permet d'arriver à ce résultat. Chaque élément peut se caractériser souvent par l'emploi de réactifs différents, mais parmi ces derniers, il faut toujours choisir celui donnant les composés les plus insolubles ; en opérant dans ces conditions, on peut espérer obtenir la précipitation en place des éléments recherchés.

GERMINATION. — Les graines de Soleil ont été placées après plusieurs lavages superficiels dans l'eau distillée 24 heures, puis mises à germer dans une capsule de porcelaine à l'obscurité à une température de 25°. Les germinations recueillies étaient classées ensuite d'après la longueur de l'axe hypocotylé. Des échantillons ont été étudiés sur coupes d'organes frais, les difficultés de coupe, sont assez fortes étant donnée la grande teneur en eau des germinations. La méthode de coupe par congélation a été employée ; d'autres échantillons ont été fixés par le formol sucré à 8 0/0 inclus dans la paraffine et coupés ensuite. L'étude par ce procédé est rendue plus commode, la fixation par le formol sucré n'introduit pas d'éléments minéraux ; il est facile aussi de vérifier si les lavages successifs au xylol et à l'alcool pour dissou-

dre la paraffine entraînent quelques éléments minéraux.

MICRO-INCINÉRATION. — L'étude histochimique de coupes fraîches a été souvent accompagnée par celle de coupes incinérées. L'incinération était réalisée : par le maintien de la coupe dans un four électrique à la température du rouge sombre. Le dépôt de cendres permet

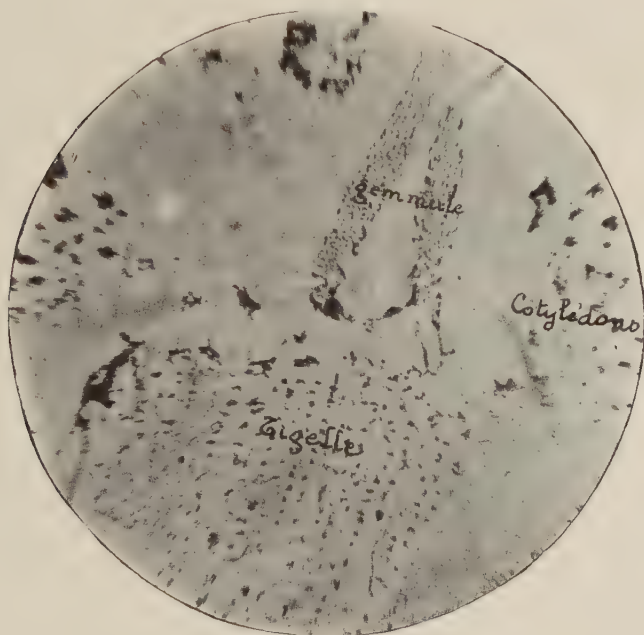


FIG. 10. — MINÉRALISATION DE LA GRAINE

Graine mûre non germée

Coupe longitudinale médiane micro-incinérée

La région gemmulaire en entier, une partie des cotylédons, une partie de la tigelle sont visibles. On aperçoit nettement la forte minéralisation des deux feuilles de la gemmule. — Grossissement linéaire : 30.

d'obtenir des renseignements sur la densité des éléments minéraux dans différentes parties de la graine, il peut aussi, dans certains cas, permettre la localisation d'éléments minéraux engagés dans l'organe frais sous forme de combinaisons organiques (1) (fig. 10).

(1) La technique de la micro-incinération a été indiquée d'une façon très précise par M. POLICARD : *Bull. d'Histologie appliquée*, t. I, janvier 1924.

3° Analyse d'extraits aqueux

L'analyse histochimique a été complétée par celle d'extraits aqueux. Après avoir pratiqué l'extraction des graisses par l'éther, le résidu fut desséché, pulvérisé et repris par l'eau froide. La solution obtenue par un premier filtrage rapide et grossier sur une toile de nickel à mailles fines, fut centrifugée à grande vitesse pour séparer les parties solides.

L'analyse des extraits aqueux obtenus à partir des graines germées ou non, a conduit à des résultats intéressants confirmant les données de la méthode histochimique. Dans toutes les opérations faites :

a) les extraits aqueux fraîchement préparés des graines non germées sont neutres au tournesol, ils ne contiennent donc aucun corps à activité acide ou basique (1).

b) Les extraits aqueux des germinations sont toujours franchement acides au tournesol, le pH de ces solutions a été déterminé par la méthode électrométrique, sa valeur est de 4,62.

c) Si on laisse au repos, l'extrait aqueux des graines non germées, on observe une acidité croissante, au bout de 48 heures le pH déterminé a été trouvé égal à 4,64. Je conclurai plus loin à propos de ces résultats.

J'indique ci-dessous les résultats décelés par la méthode histochimique, combinée à l'étude d'extraits aqueux, en commençant par les corps dont les proportions sont les plus importantes : phosphore, potassium, magnésium, calcium.

4° Résultats

PHOSPHORE

a) Graine non germée

La radicule ne décèle aucune trace d'acide phosphorique par l'emploi du réactif magnésien ; le réactif

(1) Némec a déterminé le pH de la graine d'*Hélianthus annuus* parmi beaucoup d'autres graines ; au moyen d'un extrait aqueux, il a trouvé 5,75. Ce chiffre n'indique pas la neutralité, mais l'auteur ne s'est pas préoccupé de l'hydrolyse qui s'accomplit dans l'extrait aqueux de la graine de soleil et provoque l'apparition des composés acides provenant des phosphatides.

molybdique donne des résultats inconstants, un très gros excès de molybdate, une forte température déterminent parfois le précipité de phosphomolybdate.

La tigelle présente les mêmes faits que la radicule. La gemmule ne fournit aucun indice de la présence de phosphates libres.

Sur des coupes micro-incinérées de telle façon qu'un squelette charbonneux soit encore présent, l'emploi du réactif molybdique donne de bons résultats. Le phosphore se montre dans toute la graine, mais particulièrement abondant dans la région du parenchyme externe des cotylédons et dans la région radiculaire. La région palissadique des cotylédons est moins riche, d'une façon nette. La gemmule ne présente pas une abondance plus grande que les autres parties de la plantule. L'extrait aqueux fraîchement préparé est neutre au tournesol, il donne une réaction positive mais peu intense, avec le réactif molybdique, il ne donne rien avec la mixture magnésienne.

ETAT DU PHOSPHORE DANS LA GRAINE NON GERMÉE

La recherche histochimique du phosphore dans la graine non germée conduit en définitive aux résultats suivants :

Pas de précipitation par le réactif magnésien, précipitation difficile et inconstante par le réactif molybdique.

Il faudra conclure de là :

La majeure partie du phosphore, sinon la totalité, est sous forme organique dans la graine de Soleil.

Si le phosphore existe sous forme minérale, c'est à l'état de phosphate de potassium ; seul, en effet, comme il sera vu plus loin, le potassium se trouve à l'état minéral dans la graine non germée.

Ce phosphate ne peut être le phosphate tripotassique PO_4K^3 , qui donnerait une réaction basique ; ce n'est pas non plus le phosphate monopotassique dont la réaction est acide. La graine étant neutre, le phosphate présent ne pourrait être que le phosphate dipotassique $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$ à réaction neutre au tournesol.

Il est encore plus logique de conclure que ce phos-

phate est engagé dans une combinaison mixte minérale et organique de la forme $\text{PO}^+\text{K}^- \text{--- R}$, R représentant le reste organique. Cette conclusion permet de comprendre l'absence de réaction au réactif magnésien, car les substitutions nécessaires pour la constitution du phosphate ammoniaco-magnésien $\text{PO}^+\text{Mg Am, 6H}^2\text{O}$ ne sont pas possibles ; il est difficile d'envisager en effet le remplacement nécessaire pour la formation du précipité, du reste organique par l'ammonium. Par contre, le précipité de phosphomolybdate peut s'expliquer, l'action brutale de l'acide azotique concentré et chaud qui est utilisé, en détruisant le complexe et libérant la partie minérale, pourra déterminer l'obtention du phospho-molybdate (1).

b) Germinations

Le phosphore a été recherché sur des coupes d'organe frais, l'emploi de coupes fixées ne peut se faire car l'enlèvement de la paraffine au moyen des dissolvants ordinaires détermine le départ des phosphates. L'utilisation du réactif molybdique demande quelques précautions ; la graine renferme, en effet, un acide spécial, l'acide chlorogénique qui réagit sur le molybdate d'ammoniaque. Il est donc nécessaire d'utiliser un excès de molybdate ; la réaction est favorisée par un chauffage vers 50-60°.

(1) Je n'ai pas poussé l'étude des produits organiques phosphorés de la graine, elle aurait exigé le traitement d'énormes quantités de graines et un matériel important d'extraction dont je ne disposais pas. Néanmoins, au cours de l'extraction des sucres de la graine par l'alcool, j'ai obtenu un produit cireux à odeur spéciale, dont l'hydrolyse était extrêmement rapide. Cette hydrolyse donne naissance à des phosphates caractérisés par le réactif magnésien.

Cette substance présente aussi les propriétés essentielles des phosphatides solubles dans l'alcool. D'autre part, il est facile de caractériser, soit par l'iode, soit par des colorants (éosine, acide picrique entre autres) la présence de grains d'aleurone dans la graine d'*Hélianthus annuus*. Les recherches de Posternak ont montré que les globoides de ces grains contiennent la phytine, éther hexaphosphorique de l'inosite $\text{C}_8\text{H}_6(\text{OH})_6$ combiné avec du calcium et du magnésium. J'indiquerai plus loin que dans la graine, l'état organique caractérise ces deux métaux. Il est donc des plus probables que la phytine est une combinaison organique phosphorée des graines d'*Hélianthus*.

Les combinaisons phosphorées — potassiques — organiques dont l'existence a été indiquée plus haut, appartiendraient à une troisième catégorie de composés phosphoriques de la graine, vraisemblablement à des protéides ; les combinaisons protéidiques — phosphorées, ont été décelées déjà dans diverses graines différentes de la graine de Soleil.

Sur des germinations dont l'axe hypocotylé atteint 5 mm., l'extrémité de la racine donne déjà une réaction positive et constante, la tige donne le même résultat, les cotylédons ne donnent pas de réaction bien nette, sauf dans la région des vaisseaux conducteurs. La formation

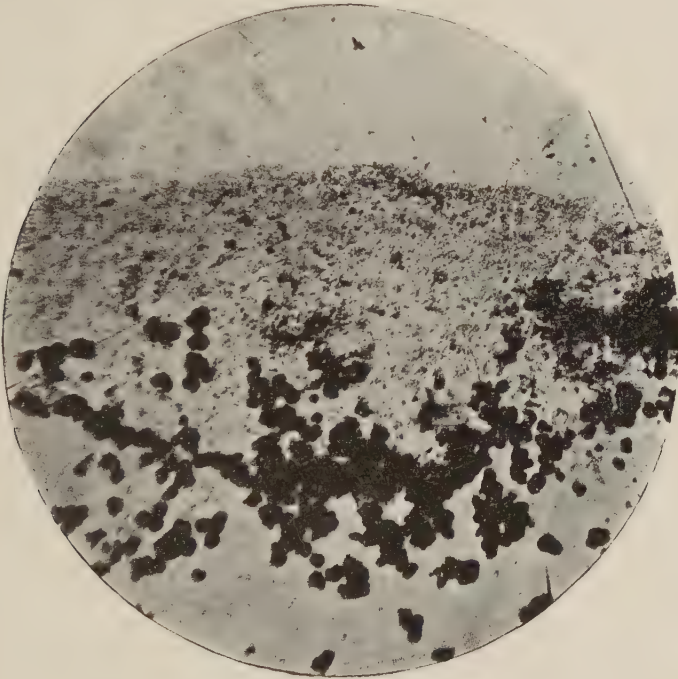


FIG. 11. — RECHERCHE DU PHOSPHORE
Graine mûre

Coupe dans la région cotylédonaire après micro-incinération

Le réactif de précipitation utilisé est l'acide phosphomolybdique. Le précipité de phosphomolybdate est formé de cristaux souvent accolés en tétrades nettement visibles à cause de leur forte réfringence. La localisation n'est pas possible, mais la densité des cristaux donne des indications sur la richesse générale en phosphore de l'organe considéré.

des phosphates est ainsi nettement indiquée dès le début. Sur des germinations de 16 mm. et de 20 mm., l'abondance des phosphates est grande, la région de la gemmule est la moins richement pourvue, la racine par contre en contient beaucoup (fig. 11).

L'emploi du réactif magnésien donne le précipité à cris-

taux étoilés caractéristiques du phosphate ammoniacomagnésien.

L'étude de l'extrait aqueux conduit aux mêmes conclusions : il précipite fortement par le réactif magnésien ou le réactif molybdique ; son acidité au tournesol est nette, la valeur du pH de cette solution est 4,62.

Les germinations écrasées sur un papier neutre de tournesol donnent immédiatement une réaction franchement acide, le colorant, prenant une teinte rouge très nette. Cette teinte ne peut être attribuée aux seuls acides gras libérés au cours de la germination, il serait bien difficile de l'admettre car ces acides sont insolubles dans l'eau et souvent, quand on peut obtenir la réaction, sont neutres aux réactifs colorés ordinaires. C'est le cas, en particulier, de l'acide oléique, constituant important de la graine d'*Hélianthus annuus*. Une solution éthérée (toujours un peu aqueuse) des graisses extraites de germinations fraîches renfermant par suite des acides gras en liberté, se montre également neutre au tournesol. Enfin, l'extrait aqueux, débarrassé par action préalable de l'éther de toute trace d'acides gras, étant acide, on peut conclure logiquement que l'acidité au tournesol des germinations est due, au moins partiellement, à des produits acides différents des acides gras.

ETAT DU PHOSPHORE AU COURS DE LA GERMINATION

Les observations faites : analyse histochimique, étude d'extraits aqueux conduisent au même résultat : apparition de phosphates en milieu acide, par suite de phosphates acides vraisemblablement. Comme l'étude des métaux le prouve, il apparaît dans les graines germées, indépendamment du potassium déjà présent, du magnésium et sans doute du calcium sous forme minérale. Il faut donc penser à la présence de phosphates acides de potassium, de magnésium, de calcium dans la graine germée.

La confirmation de ce résultat peut se trouver dans une étude plus approfondie de la solution aqueuse.

Une étude quantitative de la solution aqueuse conduit aux résultats suivants :

30 gr. de germinations sèches ont été traitées, l'acide phosphorique a été dosé par le réactif magnésien. Le poids de pyrophosphate obtenu finalement égale 0,329 correspondant à 0 gr. 091 de phosphore. L'extrait aqueux analysé avait un volume de 125 cm³, le pH de la solution aqueuse déterminé électrométriquement, était de 4,62. Ce chiffre indique une acidité réelle due aux phosphates acides présents ; il est possible d'en tirer quelques indications sur les corps déterminant cette acidité. Le phosphate dominant est évidemment PO⁴KH². S'il était seul présent, le pH de la solution, d'après les tables de dissociation, serait 6,7, si l'acide phosphorique était seul, le pH serait 2,05 ; comme le résultat expérimental trouvé est 4,62, il faut supposer la présence simultanée de l'acide et du sel acide (1).

Il est possible d'examiner le problème de plus près et de conclure la présence, en effet, de l'acide phosphorique et du phosphate acide. Je limiterai la démonstration à 2 corps, PO⁴H³ et PO⁴KH². L'ionisation de PO⁴KH² conduit à PO⁴H² et K l'ionisation de PO⁴H³ conduit en premier lieu à PO⁴H² et H. La concentration de la solution est donnée par l'expérience. 125 cm³ renfermaient 0 g. 091 de phosphore, soit 0,728 0/00. La concentration moléculaire exprimée en phosphore est donc

$$\frac{0,728}{31} = 0 \text{ gr. } 0235.$$

Donc $C_{\text{PO}^4\text{H}^2} + C_{\text{PO}^4\text{H}^3} = 0,0235.$

On peut arriver à exprimer les deux concentrations, en s'aidant de la valeur expérimentale trouvée pour le pH.

La loi d'action de masse appliquée à la réaction



$$\frac{C_{\text{H}} \cdot C_{\text{PO}^4\text{H}^2}^{\text{P}}}{C_{\text{PO}^4\text{H}^3}} = K.$$

(1) En étudiant d'après les proportions des divers éléments dans la graine, s'il est possible de trouver tout le phosphore nécessaire pour constituer l'acide phosphorique pouvant saturer les bases présentes on arrive à un résultat positif. En supposant tous les métaux sous forme minérale et sous forme de phosphates, deux hypothèses qui ne sont jamais complètement réalisées, il est facile de calculer que sur les $\frac{78}{10000}$ de phosphore contenus dans la graine, 75,5 sont nécessaires pour constituer les phosphates. Le phosphore est donc en quantité suffisante et même en excès.

K est fourni par les tables de constantes de dissociation, il vaut $9 \cdot 10^{-3}$. C_H nous est donné par le résultat expérimental de l'opération de détermination du pH de la solution. Le $pH = 4,62$, donc $C_H = 10^{-4,62}$. Par suite

$$10^{-4,62} \cdot C_{PO_4H_2} = 9 \cdot 10^{-3} \cdot C_{PO_4H_3}$$

Mais $C_{PO_4H_3} = 0,0235 - C_{PO_4H_2}$

Donc $10^{-4,62} \cdot C_{PO_4H_2} = 9 \cdot 10^{-3} (0,0235 - C_{PO_4H_2})$

$$C_{PO_4H_2} (10^{-4,62} + 9 \cdot 10^{-3}) = 9 \cdot 10^{-3} \times 0,0235$$

$$C_{PO_4H_2} = \frac{9 \cdot 10^{-3} \times 0,0235}{10^{-4,62} + 9 \cdot 10^{-3}}$$

$$C_{PO_4H_2} = 0,0234.$$

$C_{PO_4H_2}$ représente ici la concentration du mélange en ions PO_4H_2 .

$C_{PO_4H_3}$ c'est-à-dire la concentration de l'acide phosphorique non dissocié sera $0,0235 - 0,0234 = 10^{-4}$.

La concentration de PO_4H_3 non dissocié étant connue, je pourrai, en considérant la dissociation de l'acide seul et non plus comme précédemment celle de l'acide en présence du sel acide, calculer la proportion de PO_4H_2 provenant de la dissociation de l'acide seul et celle provenant de PO_4KH_2 seul.

La formule $\frac{C_H \cdot C_{PO_4H_2}}{C_{PO_4H_3}} = 9 \cdot 10^{-3}$ exprime cette dissociation. Dans la décomposition en ions de PO_4H_3 en PO_4H_2 et H il est évident que $C_H = C_{PO_4H_2}$ donc

$$\begin{aligned} C_H \cdot C_{PO_4H_2} &= (C_H)^2 \\ (C_H)^2 &= 9 \cdot 10^{-3} \times 10^{-4} \\ (C_H)^2 &= 90 \cdot 10^{-2} \cdot 10^{-4} \\ C_H &= 9,5 \cdot 10^{-3}. \end{aligned}$$

Donc $C_{PO_4H_2}^{Acide}$ c'est-à-dire la concentration en ions PO_4H_2

provenant de l'acide est aussi égal à $9,5 \cdot 10^{-3}$. La concentration des ions PO_4H^2 provenant alors de $\text{PO}_4\text{H}^2\text{K}$ sera

$$C_{\text{PO}_4\text{H}^2}^{\text{Sel}} = 0,0235 - 9,5 \cdot 10^{-3}$$

$$C_{\text{PO}_4\text{H}^2}^{\text{Sel}} = 13,9 \cdot 10^{-3}$$

Le nombre d'ions PO_4H^2 provenant de la dissociation du sel acide est ainsi supérieur au nombre d'ions provenant de la dissociation de l'acide seul.

La détermination du $p\text{H}$ conduit ainsi à admettre dans la solution étudiée l'existence de phosphate acide de potassium en présence d'acide phosphorique, la proportion du sel étant plus grande que celle de l'acide. Je ne table-
rai pas sur les résultats numériques obtenus puisque dans la solution en question peuvent se trouver d'autres phosphates acides, des sulfates, de chlorures. Mais l'indication qualitative trouvée est intéressante puisqu'elle donne une idée du milieu où se passe la saponification, cette constitution du milieu étant en accord aussi avec les constatations déduites de l'analyse chimique seule.

En définitive, le milieu fortement aqueux des germinations se compose essentiellement de phosphates acides (K , Mg , Ca), et pour une très faible partie d'acide phosphorique, de sulfates, de chlorures des mêmes métaux ; l'étude, en effet, des métaux confirme, comme nous le verrons plus loin, leur apparition sous forme de sels minéraux.

LÓCALISATION DU PHOSPHORE PENDANT LA GERMINATION

Le phosphore étudié sur des germinations de 11 mm., 16 mm., 29 mm. se montre surtout abondant dans les racines, la tige et également la gemmule.

POTASSIUM

a) Graines non germées

Le potassium est recherché sur les coupes par l'emploi du réactif de Fischer (nitrite de soude, acide acétique, chlorure de cobalt), le précipité de cobaltinitrite de potassium formé extrêmement peu soluble, permet une bonne

caractérisation du métal, les cristaux jaune orangé apparaissent comme de petites sphérules sur les coupes. Le réactif cobaltique n'est utilisable que s'il est fraîchement préparé (1).

La radicule contient du potassium dans la région corticale et épidermique, le métal est beaucoup moins abondant dans la région du cylindre central.

La tigelle renferme également du potassium en abondance dans l'écorce, il est assez peu répandu dans la partie interne de l'écorce, l'endoderme, le péricycle, mais plus abondant dans la région médullaire.

La gemmule est extrêmement riche en potassium ; sur une coupe longitudinale intéressant la gemmule, la tigelle, la radicule, on peut observer facilement la formation du précipité d'abord dans la gemmule, ensuite à l'extrémité de la radicule. Cette localisation du potassium est caractéristique dans l'embryon.

Les cotylédons contiennent aussi le métal, le précipité de cobaltinitrite est surtout abondant dans le tissu parenchymateux externe de l'épiderme. Comparés à la plantule sur une coupe longitudinale, par exemple, on constate toujours la richesse plus forte de la région gemmulaire, une abondance sensiblement égale dans la région corticale de la tigelle et les cotylédons.

Les coupes micro-incinérées conduisent aux mêmes observations : gemmule et extrémité de la radicule sont les organes de condensation, les cotylédons sont moins riches, la tigelle et la radicule (sauf la pointe) sont les parties les plus pauvres.

ETAT DU POTASSIUM DANS LA GRAINE

Les résultats obtenus indiquent l'existence du potassium, soit sous la forme minérale et dans cet état pour les raisons indiquées à propos du phosphore, c'est le *phosphate dipotassique* PO^4K^2H , dont il faut admettre l'existence, soit sous forme de *composés organiques de la forme* PO^4K^2R , dans lesquels le potassium se décèle,

(1) Le chlorure de platine donne bien de beaux cristaux jaunes mais ne permet jamais la localisation.

soit directement, soit par l'effet d'une décomposition rapide de ces composés sous l'influence des réactifs. Le potassium se trouve aussi à l'état de chlorure, l'acide chlorhydrique est en effet décelable.

b) Germinations

Dans les germinations de 4 et 6 mm., il est facile d'observer un enrichissement net de toute la plantule en potassium, une émigration du métal à partir des réserves cotylédonaire s'est déjà ébauchée. Le précipité de nitrite cobalti-potassique est très abondant à l'extrémité de la racine, dans la tigelle ; les vaisseaux conducteurs le contiennent, la gemmule est très riche (fig. 12).

Sur des coupes transversales faites au niveau de la gemmule et intéressant également les cotylédons, l'abondance du potassium est caractéristique dans les feuilles gemmulaires vis-à-vis des cotylédons. Là, également, j'ai pu observer la formation du précipité dans la gemmule. Le potassium est également fort répandu aux points d'attache des cotylédons et de la tige, lieu en somme de déversement des réserves potassiques venant des cotylédons ; il est possible même dans ces régions de localiser le métal dans les vaisseaux.

Des germinations de 11 mm., 18 mm. précisent les mêmes observations ; sur des graines où les phénomènes de germination sont encore plus évolués : 30-35 mm., les cristaux obtenus sont beaucoup plus clairsemés, la dilution des solutions potassiques s'est évidemment accrue avec la pénétration de l'eau dans la plantule.

EXTRAITS AQUEUX

Les extraits aqueux des germinations contiennent le métal ; le réactif chloroplatinique, le réactif de Fischer le décèlent tous deux.

ETAT DU POTASSIUM DANS LES GERMINATIONS. LOCALISATION

Les faits exposés à propos du phosphore m'ont amené à cette conclusion que le potassium devait se présenter dans les germinations sous la forme de

phosphate monopotassique PO^4KH^2 à réaction acide. Le métal est également présent, mais en bien moins grande quantité, sous forme de chlorure et sans doute de sulfate,

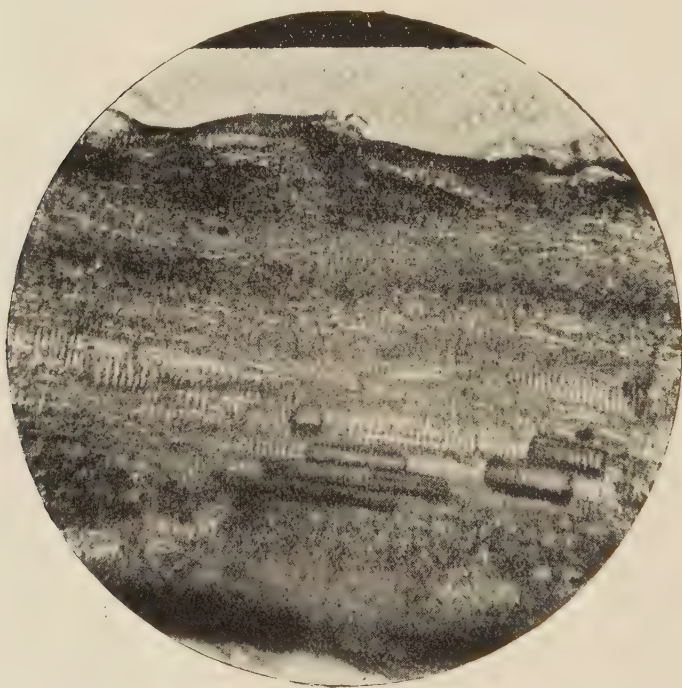


FIG. 12. — POTASSIUM

Coupe longitudinale de la racine dans une germination

Précipité par le réactif cobalto-nitrique, les cristaux de nitrite cobalti-potassique ne s'observent qu'autour de la coupe, avec des contours arrondis. La microphotographie ne permet pas de les voir sur la coupe même, en particulier dans les vaisseaux du bois, que l'on aperçoit assez distinctement. — Grossissement linéaire 140.

l'acide sulfurique pouvant se caractériser dans les extraits aqueux.

Le métal présente des phénomènes de migration nets, il part des cotylédons et se rend par les vaisseaux libériens aux régions de croissance : extrémité de la racine, gemmule surtout.

MAGNESIUM

a) Graines non germées

Le magnésium est recherché par le phosphate de soude, la coupe une fois traitée est exposée à l'action de vapeurs ammoniacales, le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien $\text{PO} \cdot \text{Mg} \cdot \text{Am} \cdot 6\text{H}^2\text{O}$ est caractéristique par la formation de cristaux étoilés comme ceux constituant les flocons de neige. La réaction est extrêmement sensible.

Sur les graines non germées, le magnésium n'est pas décelable par le réactif ; aucune des parties, radicule, tigelle, gemmule, cotylédons ne donne un résultat positif.

L'état organique du magnésium dans la graine non germée est indiscutable.

Si l'étude est faite sur des coupes micro-incinérées, le magnésium est décelé immédiatement, le précipité qui se forme sur place permet la localisation du métal dans la région externe des cotylédons. La région palissadique est moins riche. La gemmule contient le métal en assez forte proportion, la radicule en possède peu.

L'étude d'extraits aqueux confirme l'analyse histochemique, le magnésium n'y est pas décelable. Par contre, si l'on pratique sur la graine une extraction par l'alcool froid à 90° , l'extrait obtenu étant évaporé à sec puis repris par l'acide chlorhydrique concentré, donne une solution où le magnésium est précipité par le phosphate de soude ammoniacal.

De toutes ces observations, il est possible de conclure à *l'état purement organique du magnésium* dans la graine non germée.

b) Graines germées

Les coupes pratiquées dans des germinations de 6 mm. ont donné, dès leur traitement par le phosphate de soude ammoniacal, de nombreux cristaux étoilés de $\text{PO} \cdot \text{Mg} \cdot \text{Am} \cdot 6\text{H}^2\text{O}$. La répartition à ce stade germinatif est assez uniforme ; le résultat indique ainsi la dislocation

immédiate des produits organo-magnésiens dès le début de la germination et l'apparition sous la forme minérale du métal.

Les germinations de 12 mm. précisent sa répartition, la région gemmulaire présente une richesse nette en

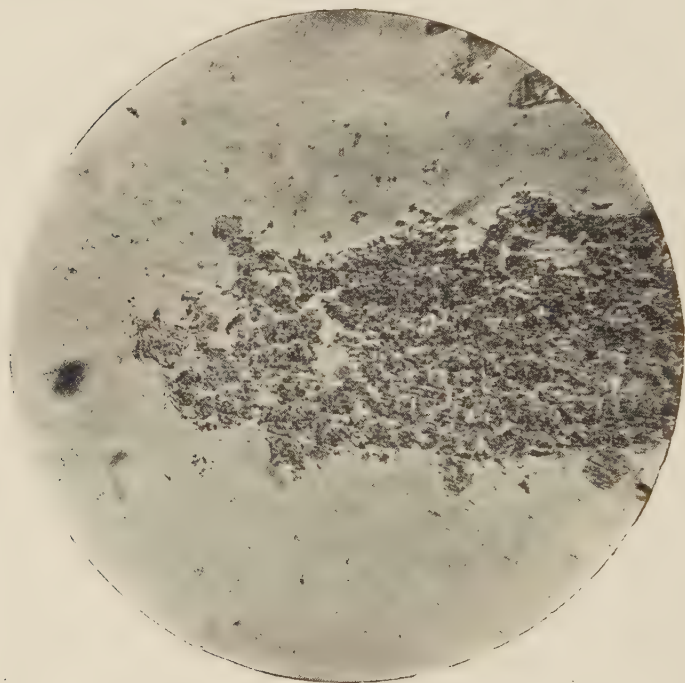


FIG. 13. — RECHERCHE DU MAGNÉSIUM

Graine germée

Coupe longitudinale de la gemmule

Le réactif de précipitation employé est le phosphate ammoniacosodique. Les cristaux de phosphate ammoniacomagnésien se présentent sous la forme de cristaux étoilés nettement visibles à l'extérieur de la coupe, et parfois même malgré leur transparence dans l'intérieur. — Grossissement linéaire : 130.

magnésium, dans la tigelle il est également présent, la racine le renferme peu, les régions médullaires de la tige et de la racine sont les plus pauvres, les régions corticales sont mieux pourvues (fig. 13).

Le fait caractéristique est l'abondance du métal dans les feuilles de la gemmule en voie de croissance.

Sur des germinations de 25 ou 30 mm., l'abondance est moins forte, dans la totalité de la plantule.

Les examens de coupes micro-incinérées confirment les faits précédemment observés : abondance du magnésium dans la gemmule et la tige épicotylée, rareté dans la racine, présence dans les cotylédons.

L'étude de l'extrait aqueux prouve la présence du magnésium sous forme minérale, ses différents réactifs le précipitent.

ETAT DU MAGNÉSIUM DANS LES GRAINES GERMÉES

Les observations précédentes prouvent la libération, au moins partielle du magnésium organique sous forme minérale. Celle-ci permet le transport du métal, transport constaté surtout dans la région gemmulaire. L'existence d'acide phosphorique, d'un peu d'acide sulfurique et de chlorure, conduit à admettre comme formes du magnésium dans les graines germées le *phosphate acide de magnésium* $(PO^4)^{2-}MgH^+$, sans doute le *sulfate*, peut-être le *chlorure*. Le caractère acide des solutions rend impossible l'existence de composés basiques.

La diminution relative de la richesse en magnésium dans les germinations avancées semble prouver l'engagement du métal à nouveau dans des combinaisons organiques, son abondance dans la gemmule est intéressante, puisque c'est là où s'élaborera surtout la chlorophylle, composé renfermant, comme l'on sait, du magnésium.

CALCIUM

a) Graines non germées

Le calcium est recherché, soit par l'oxalate d'ammonium acétifié, quoique le précipité formé de petits granules très fins diffus, n'ait rien de caractéristique, soit par l'emploi d'une solution à 2 0/0 d'acide sulfurique. Mais ce dernier réactif, s'il donne de beaux cristaux de sulfate, ne permet pas la localisation et peut, d'autre part, détruire des composés organiques du calcium, laissant par ce fait supposer l'existence du métal sous

forme minérale, alors que cette forme peut ne pas exister.

La radicule ne présente aucun précipité par l'emploi d'oxalate d'ammonium, mais l'acide sulfurique, après évaporation de la goutte déposée sur les coupes, donne des cristaux de sulfate très grands, lamellaires, quelques-

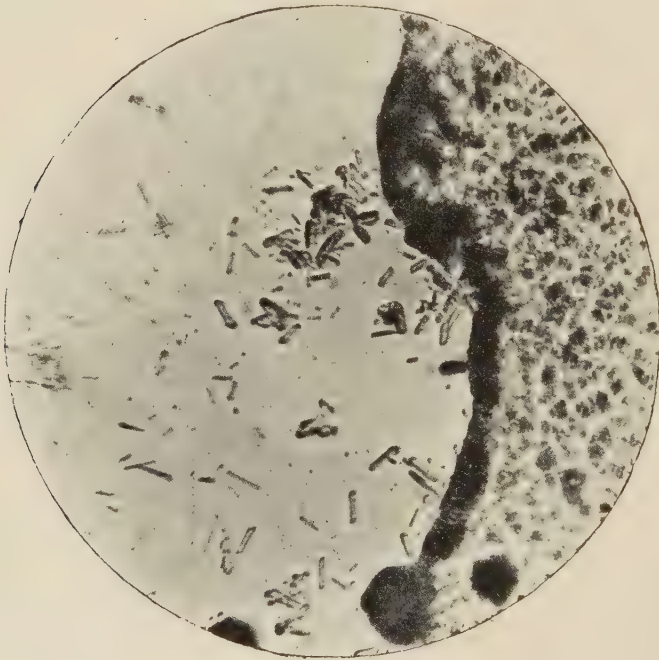


FIG. 14. — RECHERCHE DU CALCIUM

Graine mûre

Coupe longitudinale de la radicule

Le réactif de précipitation est l'acide sulfurique très étendu.

Les cristaux de sulfate de calcium formés sont surtout visibles en dehors de la coupe, cependant on peut apercevoir dans la région cuticulaire de l'épiderme de gros sphéro-cristaux composés. — Grossissement linéaire : 130.

uns radiés (fig. 14). Il est difficile de conclure de ces faits à la forme du calcium. Les mêmes observations peuvent se répéter sur la tigelle, il est à remarquer cependant que des fragments isolés de cuticule épidermique donnent de nombreux cristaux, on peut donc supposer l'existence abondante du métal dans l'épiderme, soit sous forme

minérale, soit sous forme de composés organiques de dissociation facile. Les tissus de la gemmule sont pauvres en calcium.

Les cotylédons donnent bien lieu aux mêmes observations que la tigelle : abondance plus grande du calcium dans la région épidermique.

Les coupes micro-incinérées traitées par les réactifs précédents donnent le calcium, mais la localisation n'est pas possible.

L'extrait aqueux ne fournit aucun précipité.

ETAT DU CALCIUM DANS LA GRAINE NON GERMÉE

Les résultats obtenus indiquent la *forme organique du calcium*, l'analyse des extraits aqueux confirme ce point de vue.

b) Graines germées

Des germinations de 5 mm., 11 mm., 18 mm. ont été étudiées, l'emploi de gouttes très fines d'acide sulfurique permet de conclure à une abondance plus grande du calcium dans la racine et d'une façon générale dans l'épiderme. L'emploi de l'oxalate d'ammoniaque dans des germinations de 18 mm. donne un précipité diffus, peu net.

Les extraits aqueux précipitent par l'oxalate d'ammoniaque acétifié.

ETAT DU CALCIUM DANS LES GERMINATIONS

Le calcium, certainement acquiert, partiellement au moins, la forme minérale dans le cours des phénomènes germinatifs, son état dans ce cas ne peut être que le *phosphate acide* $(\text{PO}_4)^{-}\text{CaH}^+$, le *sulfate* peut aussi exister mais en quantité bien minime, l'existence de chlorure est des plus douteuses.

La localisation du métal n'est guère possible pour les raisons indiquées précédemment.

FER

a) Graines non germées

Le fer est recherché sur les coupes par l'emploi du ferri-cyanure ou du ferro-cyanure et d'une solution chlorhydrique étendue ; le bleu de Prusse ou de Turnbull, produits permettant une détection facile du métal.

L'action directe de ces réactions sur les coupes minces ($15\ \mu$ d'épaisseur) ne donne aucune coloration visible ; s'il y a du fer, il est, soit à l'état organique, soit en quantité extrêmement faible. J'ai opéré autrement, en plongeant plusieurs heures la graine dans une solution de ferro-cyanure ou de ferri-cyanure, puis en la plaçant ensuite dans une solution d'acide chlorhydrique à 5 0/0. La réaction se fait alors dans les tissus mêmes et permet la localisation. De cette façon, mais seulement sur des coupes épaisses, le fer apparaît dans la région interne du parenchyme cortical de la radicule et la coloration bleue très faible dénote des quantités très minimes du métal. La même opération, pratiquée sur la tigelle, indique l'existence du fer vers le point d'attache des cotylédons. Les recherches effectuées par l'emploi du sulfure d'ammonium, du sulfo-cyanure de potassium ne donnent pas d'autres résultats.

Dans les cotylédons, une légère teinte bleue obtenue dans les mêmes conditions indique la présence du fer dans le parenchyme cortical externe des cotylédons.

ETAT DU FER DANS LA GRAINE NON GERMÉE

Le fer est, en définitive, très peu répandu sous forme minérale, si l'étude des germinations donne des résultats plus nets, à ce point de vue, il faut conclure à l'existence de *composés organiques* dans la graine non germée.

b) Graines germées

Les coupes pratiquées sur des germinations très peu évoluées (3 mm.-4 mm.) ne donnent aucune réaction sensible, mais des germinations plus avancées (20 mm.) donnent la coloration nette du bleu de Prusse sans localisation caractéristique.

L'extrait aqueux donne la même réaction. En définitive, la libération du fer organique des graines se produit pendant la germination, mais assez tardivement, sa répartition est uniforme.

ALUMINIUM

Je n'ai pu déceler le métal dans la graine, mais les germinations permettent de le déceler sous forme minérale par le chlorure de coésium.

SOUFRE

Graines non germées

L'action du chlorure de baryum ne précipite rien.

Germinations

Les sulfates apparaissent, mais leur caractérisation ne peut se faire par le chlorure de baryum, lequel précipite justement les phosphates. L'extrait aqueux de germinations de 6 mm., 11 mm., 18 mm., 35 mm., 50 mm., dans lesquelles l'acide phosphorique a été précipité, a toujours donné, ensuite, le précipité de sulfate de baryum.

Ainsi, le *soufre se minéralise* au cours de la germination, il n'est pas localisable. Les sulfates présents sont essentiellement, le sulfate de potassium, le sulfate de magnésium, le sulfate de calcium.

CHLORE

L'emploi du nitrate d'argent ou du sulfate de thallium détermine la production, dans les graines germées et non germées, d'un précipité de grains excessivement fins, animés du mouvement Brownien. L'extrémité de la radicule ou de la racine est la région la plus riche. Les *chlorures* de potassium, de magnésium, de fer, etc., peuvent exister.

ACIDE AZOTIQUE

La diphénylamine sulfurique ne décèle la trace d'aucun azotate, soit dans la graine, soit dans la germination.

ACIDE CARBONIQUE

L'action de l'acide chlorhydrique sur les graines germées ou non ne détermine aucun dégagement gazeux.

VII. RÉSUMÉ GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE DES SUBSTANCES MINÉRALES DE LA GRAINE ET DES GERMINATIONS D'HÉLIANTHUS ANNUUS

Le résumé général des résultats obtenus dans l'étude de substances minérales se trouve indiqué dans le tableau (page 80), au triple point de vue des proportions, de l'état chimique, de la localisation quand il a été possible de le faire.

Les traits essentiels, en ce qui concerne l'état chimique des substances minérales peuvent se résumer ainsi :

1° La *graine non germée constitue un milieu neutre où les substances minérales sont rares* (phosphate de potassium, $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$, chlorure de potassium).

2° La *graine germée constitue un milieu acide où les substances minérales sont abondantes : les phosphates acides en représentent la grande majorité*. L'acide phosphorique libre existe, les sulfates et les chlorures sont présents. Tous les métaux de la graine peuvent s'y trouver à un moment ou à un autre sous une forme minérale.

		PHOSPHORE	POTASSIUM	MAGNÉSIUM	CALCIUM	ALUMINIUM	SILICIUM	SOUFRE	FER	CHLORE	MANGANÈSE	ZINC
Graine non germée	Proportions pour 100 0	78	78	31	20	6,6	3	1,15	0,6	Traces	Traces	Traces
		Localisation	Gemmule	Cotylédons	Epiderme	?	?	?	Tigelle			
	Radicule		Cotylédons	Gemmule	?				Cotylédons	Radicule		?
	Etat		PO ₄ K ² R	PO ₄ K R	Combinaisons organiques	Combinaisons organiques	Combinaisons organiques	Non recherché	Combinaisons organiques	Combinaisons organiques et minérales	Chlorure de Potassium	?
		PO ₄ K ² H Ph ₃ line Phosphatides	PO ₄ K ² H									

Germinations	Localisation	Cotylédons	Gemmule	Cuticule	?	Non recherché	Diffus	Diffus	Racine	?	?
		Radicule	Racine	Epiderme							
	Etat	Gemmule	Ecorce								
				(PO ₄) ₂ MgH ⁴	(PO ₄) ₂ CaH ⁴	Phosphate Sulfate	Non recherché	Sulfates	Phosphate Sulfates	Chlorures (K)	?

INTERVENTION DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX DE LA GRAINE AU COURS DE LA SAPONIFICATION

I. INTRODUCTION

J'ai indiqué au début de ces recherches, le nombre relativement restreint des travaux biochimiques se rapportant à la saponification des réserves grasses, dans les conditions mêmes où ce phénomène s'accomplit dans la graine. Les travaux de Leclerc du Sablon, Maquenne, Maze, Ivanov, Miller, etc..., ont été conduits à un autre point de vue, et les recherches exposées par M. Nicioux dans sa thèse : *Contribution à l'étude de la saponification des corps gras* (Paris, 1906) sont plutôt purement chimiques que biochimiques. Ces travaux sont les suivants:

1° Recherches de Pelouze (1855) qui le premier indique le phénomène de la saponification dans les graines oléagineuses, phénomène produit par le contact des éléments de ces graines.

2° Recherches de Maillot (1880) qui extrait des graines de ricin une poudre blanche soluble dans l'eau et l'alcool, douée de pouvoir saponifiant d'après les essais, seulement qualitatifs, de l'auteur.

3° Etude de Green (1890) et de Siegmund (1890) qui

tous deux arrivent séparément à obtenir des graines de ricin un extrait aqueux ou glycéринé à pouvoir faiblement lipolytique (6 à 7 0/0 d'huile sont seulement saponifiés), mais opèrent dans des conditions telles que des fermentations peuvent aussi bien produire ce degré d'acidité que les acides gras libérés (1).

4° Recherches de Connstein, Hoyer, Wartenberg (1902) qui montrent que la graine de ricin, en présence de l'eau, dédouble l'huile à condition d'opérer dès l'origine en milieu *acide* (acide acétique, acide sulfurique, acide phosphorique, sels acides).

5° Travaux de M. Nicloux (1906) qui arrive aux conclusions suivantes : la graine de ricin mélangée à de l'huile en présence d'eau *acide* la saponifie ; la partie de la graine douée du pouvoir saponifiant est le cytoplasme ; l'action du cytoplasme n'est pas due à une diastase au sens même où l'on définit ces corps. Cette action cesse en effet en présence de l'eau dès que le cytoplasme n'est plus protégé par l'huile. La substance saponifiante que M. Nicloux dénomme lipaséidine n'a pas été isolée du cytoplasme, mais ses lois d'action sont analogues à celles des diastases catalysant des réactions d'équilibre. L'action de différentes substances (acides, sels acides, mélanges de sels neutres) a été étudiée par M. Nicloux en présence du cytoplasme sur la saponification ; l'auteur arrive à cette conclusion que la qualité de l'acide importe surtout et non pas l'acidité absolue. Dans la graine, enfin, l'acidité serait due au gaz carbonique.

Comme je l'ai déjà indiqué, ces études n'ont pas tenu compte du milieu minéralisé constitué par la graine germée. L'étude faite précédemment, a donné des précisions sur la constitution de ce milieu, milieu acide, où les phosphates acides représentent l'élément essentiel. J'ai donc tenté à partir de ces données, de vérifier par des expériences précises si, véritablement, ces substances agissent dans la saponification. Il était nécessaire pour cela, de

(1) M. NICLOUX, *Thèse Sc.*, Paris, 1906.

préparer l'agent ou la substance lipolytique de la graine de Soleil, d'étudier les conditions d'action de cette substance en présence des composés de la graine germée et dans les conditions de concentration et d'acidité réelle où ces composés se rencontrent dans la germination d'Hélianthus. Enfin, ces expériences ont été faites sur l'huile d'Hélianthus uniquement afin de rester toujours dans les conditions naturelles de la germination.

II. PRÉPARATION DE LA SUBSTANCE LIPOLYTIQUE

M. Nicloux, dans son étude de la substance saponifiante de la graine de ricin, a montré que dans le cas de cette graine, l'agent lipolytique, tout en présentant le mode d'action des diastases, n'en avait pas les propriétés ordinairement connues et n'agissait pas dans les mêmes conditions. Il a démontré en effet, que le cytoplasme de la graine était l'agent exclusif de la décomposition des graisses, et nommé lipaséidine le corps inconnu, d'ailleurs qui devait représenter l'élément actif de ce cytoplasme. La lipaséidine ne peut être extraite selon lui, par les procédés ordinaires d'obtention des diastases, la présence de l'eau faisant perdre au cytoplasme toutes ses qualités saponifiantes dès que le cytoplasme n'est plus protégé par l'huile (1).

Il était intéressant de confirmer par l'étude de la graine de Soleil si l'agent lipolytique présentait les mêmes caractères.

Si l'on traite des graines d'Hélianthus annuus par l'éther, puis par l'alcool, on obtient une poudre débarrassée de l'huile et des réserves sucrées. Cette poudre, analogue aux poudres fermentaires dont Hérissé y a indiqué la préparation générale lors de la recherche des diastases hydrolysantes des glucosides, possède un pouvoir d'inversion très actif vis-à-vis du saccharose (au bout d'une heure, la solution de saccharose en présence de la poudre fermentaire possède un pouvoir réducteur marqué). Si l'on veut déterminer la saponification de l'huile par cette poudre, l'opération tentée en milieu acide (acide acétique, acide phosphorique) conduit à des résultats

(1) Cependant on peut l'obtenir en broyant les graines dans l'eau, après repos une couche supérieure monte en surface et contient la substance qui saponifie. Peut-être d'ailleurs cette couche supérieure renferme-t-elle l'huile protectrice de la dite substance. (Fette, Oele, Seifen ; H. GROSSMANN, *Handwörterbuch der natur wissenschaft*. T. III, p. 1033).

nuls. Ainsi la préparation d'une véritable lipase par des procédés utilisés pour l'obtention des diastases échoue avec la graine d'Hélianthus comme avec la graine du ricin.

Devant ce résultat, j'ai utilisé la méthode ingénieuse de M. Nicloux pour préparer le cytoplasme. Les graines de Soleil décortiquées ont été broyées dans de l'huile d'arachide, tamisées sur des toiles de nickel à mailles très fines, puis sur toile de soie et soumises à une centrifugation dont la vitesse atteignait trois mille tours par minute. Au bout de 15 minutes, la séparation s'était complètement effectuée en :

1° Une couche supérieure formée par l'huile.

2° Une couche moyenne grisâtre correspondant au cytoplasme.

3° Une couche inférieure formée de débris cellulaires et de nombreux grains d'aleurone présents dans la graine d'Hélianthus annuus.

Le cytoplasme a été extrait au moyen d'une pipette, deshuilé par centrifugation en présence de l'éther, desséché et étudié ensuite au point de vue de ses qualités saponifiantes, en présence des sels dont j'ai constaté l'existence dans la graine germée (1).

(1) Une remarque évidente au sujet de cette diastase ou substance saponifiante, c'est l'échec complet des essais tentés pour la séparer ; la séparation imaginée par Nicloux a mis en évidence simplement ce fait, que cette substance est renfermée en somme dans le protoplasme. M. Nicloux a séparé les grains d'aleurone dont le pouvoir lipolytique est à peu près nul, de ce cytoplasme, il a ainsi délimité plus précisément, le cercle où devait se faire la recherche de la diastase, mais il n'a pas plus réussi que ses devanciers à la préparer. Les expériences intéressantes qu'il a faites sur la destruction par l'eau du pouvoir saponifiant de la graine de ricin, conduisent à ces conclusions : soit à la destruction de la lipase supposée existante, par l'eau, ce qui semble difficile à admettre puisque dans la germination l'action lipolytique s'exerce en présence d'une quantité énorme d'eau, soit à la destruction d'un état physique spécial (concentration par exemple de la substance agissante) que l'action de l'eau sur un cytoplasme extrait de la graine peut facilement altérer.

III. SAPONIFICATION DE L'HUILE DE SOLEIL EN PRÉSENCE DES SUBSTANCES MINÉRALES DE LA GRAINE GERMÉE DE LA GRAINE DE SOLEIL

La réalisation d'expériences devant s'effectuer dans des conditions se rapprochant le plus de la germination nécessite la connaissance non seulement des corps chimiques présents au moment de la germination, mais aussi celle au moins approximative des concentrations de ces corps. Il est possible d'arriver à ce résultat.

Concentration des solutions utilisées

La concentration des solutions dépend évidemment du poids du composé dissous que l'analyse chimique nous permet de connaître, du poids d'eau dissolvant que l'étude des germinations permet d'évaluer.

J'ai déterminé ce poids d'eau dans des germinations prises à différents états d'évolution (l'état étant caractérisé toujours par la longueur de l'axe hypocotylé) ; ces germinations ont été ensuite totalement desséchées dans une cloche où le vide était poussé à 6 mm. en présence d'acide sulfurique. Les résultats trouvés sont traduits par les courbes du graphique (fig. 15), le poids sec des germinations s'est maintenu sensiblement le même ; pour prendre les cas extrêmes, le poids d'une graine germée dont l'hypocotyle atteint 10 mm., a sensiblement doublé, celui d'une graine de 80 mm. est multiplié par 8. On peut donc admettre que les sels en dissolution dans le premier cas sont contenus dans 0 cm³ 05 d'eau, dans le deuxième cas, ils sont dilués dans 0 cm³ 35, le poids primitif étant 0 gr. 05.

Il est possible, étant donné ces chiffres, d'établir les

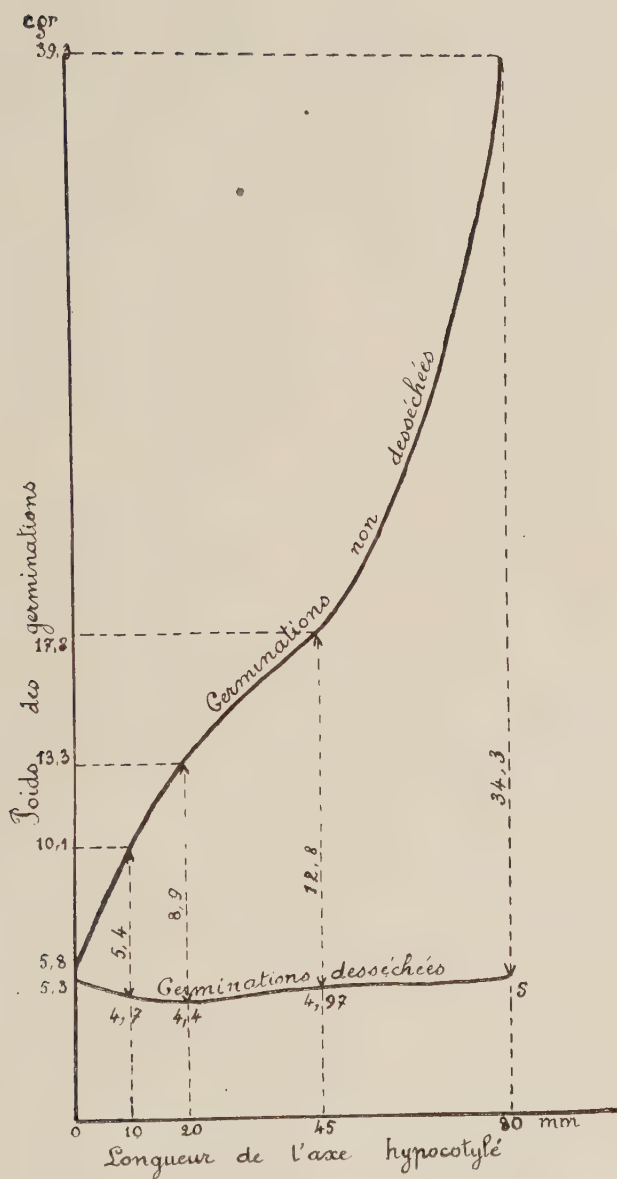


FIG. 15

concentrations extrêmes dans lesquelles se maintiendront les substances salines.

La graine germée renferme, comme l'analyse nous l'a indiqué, des phosphates acides (K, Mg, Ca), des sulfa-

tes en très faible quantité ainsi que des chlorures, elle renferme aussi de l'acide phosphorique libre ; je calculerai les concentrations de ces corps.

a) Concentrations en phosphate monopotassique $\text{PO}'\text{KH}^2$

Le potassium, comme il a été vu, se trouve à l'état minéral dans la graine germée, j'admets ici qu'il est totalement à cet état.

Sa proportion dans la graine est $\frac{78}{10.000}$, son poids absolu dans une graine est donc $\frac{0,05 \times 78}{10.000}$, le poids de phosphate correspondant est par suite :

$$p = \frac{0,05 \times 78}{10.000} \times \frac{136}{39},$$

136, poids musculaire de $\text{PO}'\text{KH}^2$, 39, poids atomique du potassium

$$p = \frac{136}{100.000}.$$

La concentration la plus forte sera représentée par la dissolution dans $0,05 \text{ cm}^3$, en rapportant à 1.000 cm^3 , sa valeur sera donnée par :

$$\frac{136}{100.000} \times \frac{1.000}{0,05} = 27,2 \text{ gr. par litre.}$$

La concentration minimum correspondra à la dilution dans $0,35 \text{ cm}^3$, sa valeur sera :

$$\frac{136 \times 1.000}{0,35} = 3,9 \text{ gr. par litre.}$$

b) Concentration en phosphate monomagnésien



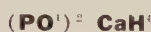
En admettant les mêmes données initiales pour les solutions, en sachant que la proportion du magnésium dans la graine atteint $\frac{31}{10.000}$ (poids moléculaire du phosphate acide : 218, poids atomique du magnésium : 31) ; la concentration maximum sera :

$$\frac{0,05}{10.000} \times 31 \times \frac{218}{24} \times \frac{1.000}{0,05} = 28 \text{ gr. par litre.}$$

La concentration minimum :

$$\frac{0,05}{10.000} \times 31 \times \frac{218}{24} \times \frac{1.000}{0,35} = 4 \text{ gr. par litre.}$$

c) Concentration en phosphate acide de chaux



(Poids moléculaire du phosphate monocalcique : 234.
Poids atomique du calcium : 40).

Proportion du calcium dans la graine : $\frac{20}{10.000}$.

Concentration maximum :

$$\frac{0,05 \times 20}{10.000} \times \frac{234}{40} \times \frac{1.000}{0,05} = 11,7 \text{ gr. par litre.}$$

Concentration minimum :

$$\frac{0,05 \times 20}{10.000} \times \frac{234}{40} \times \frac{1.000}{0,35} = 1,7 \text{ gr. par litre.}$$

d) Concentration en acide phosphorique

La concentration en acide phosphorique est difficile à évaluer, elle est nécessairement très faible, étant données les bases présentes qui peuvent saturer l'acide. En supposant tout le phosphore à l'état d'acide, on a évidemment des valeurs bien supérieures au maximum de concentration.

En se basant cependant sur cette donnée, et en sachant que le phosphore représente les $\frac{78}{10.000}$ du poids de la graine, ces concentrations maxima s'échelonnaient entre :

$$\frac{0,05 \times 78}{10.000} \times \frac{98}{31} \times \frac{1.000}{0,05} = 24,6 \text{ gr. par litre pour le début}$$

$$\text{de la germination et } \frac{0,05 \times 78}{10.000} \times \frac{1.000}{0,35} = 3,5 \text{ gr. par litre}$$

pour la fin du phénomène germinatif. La moyenne de ces deux chiffres ressort à 14 gr. par litre. J'ai indiqué précédemment qu'en supposant toutes les bases saturées, on pouvait encore trouver trois à quatre dix-millièmes de

phosphore non combiné aux bases sous la forme d'acide phosphorique libre, soit le $\frac{1}{25}$ environ du phosphore total. En appliquant ce résultat au chiffre précédent, on peut penser obtenir une concentration voisine de celle existant dans la graine, soit $\frac{14}{25} = 0,56$ gr. par litre.

e) Concentration en sulfates

Il est assez logique de penser que les sulfates sont représentés par le sulfate de magnésium, le sulfate de potassium, celui de calcium. La détermination des concentrations en sulfate peut se faire en considérant le poids moléculaire moyen des trois sels en question (146) et le poids atomique moyen des métaux considérés (36).

Le soufre représente $\frac{1,15}{10.000}$ dans la graine. La concentration correspondante à 0,05 cm³ sera donc :

$$\frac{0,05 \times 1,15}{10.000} \times \frac{146}{36} \times \frac{1.000}{0,05} = 0,46 \text{ gr. par litre pour le}$$
chiffre maximum.

La concentration minimum étant :

$$\frac{0,05 \times 1,15}{10.000} \times \frac{146}{36} \times \frac{1.000}{0,35} = 0,065 \text{ gr. par litre.}$$

Ces concentrations sont très faibles.

Saponification en présence du cytoplasme

Technique

Toutes les expériences ont été réalisées de façon semblable. L'huile de tournesol, dont l'acidité était déterminée par une expérience préalable, était introduite dans un flacon. 30 gr. d'huile, puis 0 g. 5 de cytoplasme étaient ajoutés, agités ensuite, de façon à les suspendre dans l'huile. J'ajoutais après la solution acide ou saline, et le flacon était bouché. L'émulsion facilitant l'attaque de l'huile, était déterminée par l'agitation entretenue en

plaçant le flacon sur un chariot animé d'un mouvement continu de va-et-vient.

Au bout d'un temps déterminé, le degré de saponification était mesuré par le dosage des acides gras libérés. Ce dosage est pratiqué suivant le mode opératoire ordinaire : pesée d'1 g. d'émulsion, dissolution de cette émulsion dans un mélange d'alcool et d'éther, dosage par la potasse titrée en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur. L'indice de saponification de l'huile de Soleil est : 190 (190 mmgr. de potasse sont nécessaires pour saponifier totalement 1 g. d'huile), la potasse employée était une solution à 9 g. 73 par litre, il aurait donc fallu 19 cm³ 32 de cette liqueur pour saponifier toute l'huile, en somme libérer tous ses acides gras. En prenant un gramme d'émulsion constituée comme je l'ai indiqué par q d'huile et p de solution, la quantité d'huile contenue (en admettant le mélange homogène) dans un gramme

sera $\frac{q}{p+q}$. Si n est le nombre de cm³ de la solution

de potasse employée pour 1 gr. d'émulsion, on aura pour 1 gr. d'huile :

$n \times \frac{p+q}{q}$, correspondant à $n \times \frac{p+q}{q} \times 9,73$ mmg.

de potasse, par suite le pourcentage d'huile saponifiée sera, ramené à 100 :

$$n \times \frac{p+q}{q} \times \frac{9,73}{190} \times 100.$$

Le choix des concentrations des solutions salines est évidemment arbitraire, entre les limites déterminées précédemment ; on peut penser aussi que dans la graine, ces concentrations ne gardent pas une valeur constante. J'ai pris le chiffre sensiblement moyen entre les deux concentrations extrêmes, ce chiffre sera toujours de l'ordre de grandeur des concentrations dans la graine.

Les expériences ont été réalisées avec un, deux ou trois des sels essentiels de la graine (phosphates acides de potassium, magnésium, calcium) en présence ou en l'absence d'acide phosphorique, les solutions de phos-

phate de potassium et de phosphate de magnésium étant en même quantité, celles de phosphate de calcium et d'acide phosphorique considérées ensemble représentant environ, le tiers ou le quart du volume total.

Les concentrations des solutions sont les suivantes :

Phosphate acide de potassium ...	15 gr.	par litre
Phosphate acide de magnésium ..	15 gr.	—
Phosphate acide de calcium	7 gr.	—
Acide phosphorique	9 gr. 875	—

Je n'indiquerai dans les expériences qui suivent que le volume des solutions employées, la quantité d'huile utilisée, les autres données sont toujours restées les mêmes.

Résultats

EXPÉRIENCE 1

Huile : 20 gr. Phosphate acide de potassium : 8 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 5,95 0/0.

— après 8 heures : 5,98 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 1,25 0/0.

EXPÉRIENCE 2

Huile : 20 gr. Phosphate acide de potassium : 18 cm³.

Acide phosphorique : 0 cm³ 5.

Huile saponifiée : après 4 heures : 6,3 0/0.

— après 8 heures : 6,25 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 1,6 0/0.

EXPÉRIENCE 3

Huile : 20 gr. Phosphate acide de potassium : 4 cm³.

Phosphate acide de magnésium : 4 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 6,25 0/0.

— après 8 heures : 6,3 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 1,55 0/0.

EXPÉRIENCE 4

Mêmes conditions que l'expérience 3, mais addition de 0 cm³ 5 d'acide phosphorique.

Huile saponifiée : après 4 heures : 7.

— après 8 heures : 7,05 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 2,35 0/0.

EXPÉRIENCE 5

Huile : 20 gr. Phosphate acide de potassium : 6 cm³.

Phosphate acide de calcium : 2 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 5,63.

— après 8 heures : 5,60.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 1,9 0/0.

EXPÉRIENCE 6

Mêmes conditions que l'expérience 5, mais addition de 0 cm³ 5 d'acide phosphorique.

Huile saponifiée : après 4 heures : 5,77 0/0.

— après 8 heures : 5,80 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 1,10 0/0.

EXPÉRIENCE 7

Huile : 20 gr.

Phosphate acide de potassium : 3 cm³ 5.

Phosphate acide de magnésium : 3 cm³ 5.

Phosphate acide de calcium : 1 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 6,61 0/0.

— après 8 heures : 6,62 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 1,9 0/0.

EXPÉRIENCE 8

Mêmes conditions que l'expérience 7, mais addition de 0 cm³ 5 d'acide phosphorique.

Huile saponifiée : après 4 heures : 6,90 0/0.

— après 8 heures : 6,86 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 2,2 0/0.

EXPÉRIENCE 9

Huile : 20 gr.

Phosphate acide de magnésium : 8 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 6,8 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 2,1 0/0.

EXPÉRIENCE 10

Mêmes conditions que l'expérience 9, mais addition de 0 cm³ 5 d'acide phosphorique.

Huile saponifiée : après 4 heures : 7,06 0/0.

— après 8 heures : 7,09 0/0.

Acidité primitive : 4,7.

Proportion saponifiée : 2,36 0/0.

EXPÉRIENCE 11

Huile : 20 gr.

Phosphate acide de magnésium : 6 cm³ 5.

Phosphate acide de calcium : 1,5 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 3,90.

— après 8 heures : 3,92.

Acidité primitive : 2,58.

Proportion saponifiée : 1,32 0/0.

EXPÉRIENCE 12

Mêmes conditions que précédemment, mais addition de 0,5 cm³ d'acide phosphorique.

Huile saponifiée : après 4 heures : 5,6 0/0.

— après 8 heures : 5,6 0/0.

Acidité primitive : 2,58.

Proportion saponifiée : 3,02 0/0.

EXPÉRIENCE 13

Huile : 20 gr.

Phosphate acide de calcium : 8 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 3,9 0/0.

— après 8 heures : 3,95 0/0.

Acidité primitive : 2,58.

Proportion saponifiée : 1,32 0/0.

EXPÉRIENCE 14

Mêmes conditions que l'expérience 13, mais addition de 0 cm³ 5 d'acide phosphorique.

Huile saponifiée : après 4 heures : 4,15 0/0.

— après 8 heures : 4,12 0/0.

Acidité primitive : 2,58.

Proportion saponifiée : 1,57 0/0.

EXPÉRIENCE 15

Huile : 20 gr.

Acide phosphorique : 8 cm³.

Huile saponifiée : après 4 heures : 4,59 0/0.

— après 8 heures : 4,60 0/0.

Acidité primitive : 2,58.

Proportion saponifiée : 2 0/0.

EXPÉRIENCE 16

Huile : 20 gr.

Acide phosphorique : 0 cm³ 5 ; eau : 7,5.

Huile saponifiée : après 4 heures : 3,26 0/0.

— après 8 heures : 3,30 0/0.

Acidité primitive : 2,58.

Proportion saponifiée : 0,58 0/0.

Des dosages faits après 5 jours n'indiquent pas une augmentation de la saponification.

De la comparaison des chiffres obtenus, il est facile de voir :

que la saponification exercée par le cytoplasme d'Hélianthus en présence des phosphates acides, de l'acide phosphorique ou de leur mélange est très faible, à la température de 18°. L'action catalytique du cytoplasme est donc extrêmement réduite. Néanmoins, la saponification par le sel acide est toujours plus active :

a) en présence de l'acide.

b) L'action activante du magnésium semble ressortir également des chiffres obtenus, quoique la faiblesse des résultats ne permette guère de conclusion ferme.

Saponification en présence de la graine complète

Devant les résultats aussi peu accentués que ceux indiqués précédemment, j'ai recommencé les expériences de saponification en présence de la graine complète, craignant que la préparation du cytoplasme enlève dans ce cytoplasme le produit actif.

Voici quelques types de ces nouvelles expériences :

Données

Graine non germée : 2 gr.

Huile : 20 gr.

Agitation : 8 heures.

Résultats

	Proportion d'huile saponifiée
Expér. 1. — Phosphate acide de potassium : 8 cm ³	1,4 0/0
Expér. 2. — Phosphate acide de potassium : 8 cm ³ . Acide phosphori- que : 0,5	1,5 0/0
Expér. 3. — Phosphate acide de magnésium : 8 cm ³	2,1 0/0
Expér. 4. — Phosphate acide de magnésium : 8 cm ³ . Acide phosphori- que : 0,5 cm ³	2,3 0/0
Expér. 5. — Phosphate acide de calcium : 8 cm ³	1,4 0/0
Expér. 6. — Phosphate acide de calcium : 8 cm ³ . Acide phosphori- que : 0,5 cm ³	1,7 0/0
Expér. 7. — Acide phosphorique : 0,5 cm ³ . Eau : 8 cm ³	1,5 0/0
Expér. 8. — Eau : 8 cm ³	0,2 0/0
Expér. 9. — Graine seule, pas d'eau	0,18 0/0

Les résultats sont toujours du même ordre de gran-

deur, extrêmement faibles. J'ai employé alors des graines germées, sans plus de succès.

Dans une dernière série d'expériences, j'ai fait varier les concentrations de l'acide phosphorique dans des limites énormes, utilisant des solutions allant de $\frac{N}{125}$ à $\frac{N}{3}$; toujours les quantités d'huile saponifiée ont été extrêmement faibles, atteignant 1 à 2 0/0 au plus.

Pour vérifier enfin la valeur de la technique utilisée, j'ai repris les saponifications dans des conditions exactement semblables mais en utilisant la graine de ricin. J'ai obtenu alors des résultats analogues à ceux de mes prédécesseurs : forte et rapide saponification (12 0/0 au bout d'une heure d'agitation, 75 0/0 après 18 heures d'action, sans agitation.

La conclusion s'imposait donc nettement : le cytoplasme ou la graine de Soleil, broyée, ne possède plus la propriété saponifiante qui s'exerce dans la graine intacte, quelle que soit la méthode suivant laquelle on obtient la graine broyée ou le cytoplasme. S'il existe une substance saponifiante déterminée, elle est détruite par l'effet du broyage, la méthode de M. Nicloux en particulier, n'a pas de valeur générale puisqu'elle échoue avec une graine aussi fortement oléagineuse que celle de Soleil (1).

Je n'ai donc pu étudier, avec la graine d'Hélianthus, l'action spéciale des différents sels acides, ou de leurs mélanges, avec ou sans présence d'acide phosphorique. Néanmoins, les indications que l'on peut tirer des faibles résultats obtenus m'ont engagé à poursuivre cette recherche en présence d'un agent saponifiant analogue selon toute vraisemblance à celui de la graine de Soleil, c'est-à-dire avec la graine de ricin.

Auparavant, j'ai procédé à quelques vérifications nécessaires me permettant de connaître approximativement, si cet agent saponifiant agissait en un milieu comparable à celui de la graine de Soleil.

(1) Les graines utilisées étaient capables de germer.

Il est facile, en effet, de vérifier :

1° que la graine de ricin non germée est neutre au tournesol.

2° que la solution obtenue en broyant cette graine est également neutre au début, mais devient rapidement acide au tournesol et à la phénolphthaléine comme pour la graine de Soleil.

3° que le phosphore est présent dans la graine germée sous forme phosphorique. (Le réactif molybdique donne un résultat douteux du fait de l'existence de matières organiques arrêtant son action, mais le réactif magnésien ne laisse aucun doute).

4° l'étude de l'action des réactifs colorés et le fait que les métaux des cendres des différentes graines sont sensiblement les mêmes, qu'en particulier, toutes les graines oléagineuses sont riches en magnésium, permet de penser que les phosphates acides présents, ne diffèrent guère de ceux de la graine d'Hélianthus.

IV. SAPONIFICATION DE L'HUILE DE SOLEIL PAR LA GRAINE DE RICIN EN PRÉSENCE DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE ET DES PHOSPHATES ACIDES (K, Mg, Ca)

Les expériences ont été conduites dans les mêmes conditions que celles réalisées avec la graine de Soleil : 20 grammes d'huile, 2 grammes de graines broyées après avoir été décortiquées, 8 cm³ de solution.

Résultats

EXPÉRIENCE 1

Acide phosphorique	0 cm ³ 5
Eau	7 cm ³ 5
Acidité primitive	0,14

Saponification	{	1 heure d'agitation, température : 22°	12,95
		au bout de 3 heures (agitation, température : 22°)	15,81
		au bout de 19 heures (sans agitation, température : 19°) ..	68,40

Toutes les conditions indiquées dans l'expérience 1 ont été réalisées dans les expériences qui suivent (agitation, température).

EXPÉRIENCES 2 ET 3

<i>n</i>) Phosphate acide de potassium	8 cm ³	
Acidité primitive	0,17	
Saponification	{ au bout d'une heure ..	24,88 0/0
	au bout de 3 heures ...	49,92 0/0
	} au bout de 19 heures ..	80,64 0/0

b) Phosphate acide de potassium	7,5
Acide phosphorique	0,5
Acidité primitive	0,14
Saponification	{ au bout d'une heure .. 26,62 0/0
	{ au bout de 3 heures .. 48,53 0/0
	{ au bout de 19 heures .. 84,63 0/0

EXPÉRIENCES 4 ET 5

a) Phosphate acide de magnésium	8 cm ³
Acidité primitive	0,14
Saponification	{ au bout d'une heure .. 43 0/0
	{ au bout de 3 heures .. 66,20 0/0
	{ au bout de 19 heures .. 88,83 0/0
b) Phosphate acide de magnésium	7 cm ³ 5
Acide phosphorique	0 cm ³ 5
Saponification	{ au bout d'une heure .. 41,52 0/0
	{ au bout de 3 heures .. 67,58 0/0
	{ au bout de 19 heures .. 89,85 0/0

EXPÉRIENCES 6 ET 7

a) Phosphate acide de calcium	8 cm ³
Acidité primitive	0,14
Saponification	{ au bout d'une heure .. 38,40 0/0
	{ au bout de 3 heures .. 64,66 0/0
	{ au bout de 19 heures .. 84,83 0/0
b) Phosphate acide de calcium	7 cm ³ 5
Acide phosphorique	0 cm ³ 5
Acidité primitive	0,14
Saponification	{ au bout d'une heure .. 45 0/0
	{ au bout de 3 heures .. 68,04 0/0
	{ au bout de 19 heures .. 84,79 0/0

EXPÉRIENCES 8 ET 9

a) Phosphate acide de potassium	3 cm ³
Phosphate acide de magnésium	3 cm ³
Phosphate acide de calcium	2 cm ³
Acidité primitive	0,14
Saponification	{ au bout d'une heure .. 40,25 0/0
	{ au bout de 3 heures .. 64,21 0/0
	{ au bout de 19 heures .. 85,10 0/0

b) Mêmes conditions avec addition de 0 cm³ 5 d'acide phosphorique.

Acidité primitive	0,14
Saponification { au bout d'une heure ..	40,2 0/0
{ au bout de 3 heures ..	65,71 0/0
{ au bout de 19 heures ..	87,02 0/0

EXPÉRIENCE 10

Graine en présence de 8 cm³ d'eau.

Saponification au bout d'une heure : 0,02 0/0.

L'émulsion n'est pas stable, l'eau se sépare immédiatement par le repos de la graine.

La préparation est laissée 16 heures dans une étuve à 19°, puis agitée ensuite et laissée 26 heures à une température de 32°. A ce moment, la saponification étudiée donne 43,56 0/0 après une nouvelle agitation, l'étude faite après une durée de 5 heures donne 72,5 0/0 comme proportion saponifiée.

L'expérience est certainement intéressante, car elle confirme nettement l'intervention des sels acides de la graine dans la saponification. Au début, le milieu n'est pas acide, comme l'étude des graines non germées le prouve, mais peu à peu et assez lentement sans doute, pour que la substance lipolytique ne soit pas altérée, les composés organiques phosphorés sont détruits, les phosphates acides apparaissent, la saponification commence, elle continue alors avec rapidité malgré la teneur extrêmement faible de la solution en phosphates acides libérés.

EXPÉRIENCE 11

Graines âgées de 27 ans.

Essai de saponification en présence du phosphate acide de magnésium. L'émulsion est mauvaise.

Saponification { au bout d'une heure	1,4 0/0
{ au bout de 25 heures	1,4 0/0

Le cytoplasme des graines âgées a perdu totalement son pouvoir émulsionnant.

V. CONCLUSIONS

Il ressort nettement des résultats obtenus :

1° *Les milieux constitués par les phosphates acides* suivant les teneurs que j'ai adoptées après l'étude quantitative des substances minérales de la graine, *conviennent parfaitement à la saponification*. Les chiffres donnant le pourcentage saponifié sont bien démonstratifs à ce sujet ; au bout d'une heure, les phosphates acides de magnésium ou de calcium, déterminent des saponifications atteignant 40 à 45 0/0, au bout de 3 heures, ce chiffre s'élève à 70 0/0. Dans les expériences de M. Nicloux, le meilleur rendement au bout d'une heure était 25 0/0 au maximum, au bout de 3 heures, 50 0/0 pour les chiffres les plus élevés. Il est à remarquer, d'ailleurs, que ces résultats ont été obtenus seulement avec le phosphate acide de calcium en présence d'un sel magnésien, c'est-à-dire avec certains des sels minéraux de la graine (1).

2° Au point de vue de la *rapidité de la saponification*, le magnésium vient en tête, suivi de très près par le calcium. Le potassium détermine des vitesses de saponification notablement inférieures, l'acide phosphorique utilisé seul, donne les résultats les moins bons. *L'influence activante du magnésium est à rapprocher de ce fait que ce métal est contenu en abondance, surtout dans les graines oléagineuses* ; celle du Calcium est intéressante à constater quand on se rappelle son intervention dans l'action des diastases (sucrase).

3° La *saponification par les phosphates acides en présence d'une faible quantité d'acide phosphorique* semble légèrement plus active que par le sel acide seul.

(1) M. NICLOUX : *Contribution à l'étude de la saponification des corps gras*, p. 65. Les conditions des expériences sont très voisines des miennes ; la proportion de cytoplasme utilisé est le 1/100 de l'huile à transformer, soit, exprimée en poids de graines complètes, 10 gr. environ. C'est la proportion que j'ai utilisée moi-même : 2 gr. de graines pour 20 gr. d'huile.

4° La *saponification est intense* si l'on entretient par l'agitation, *une émulsion convenable*, si l'agitation est cessée (après la troisième heure dans mes expériences à cause des nécessités du laboratoire), la vitesse de saponification est bien moins accentuée, la cause en est évidemment à la diminution des surfaces réagissantes par suite d'une émulsion moins entretenue.

Le même phénomène permet de concevoir en partie l'absence presque totale de saponification par le cytoplasme en milieu ne contenant pas de phosphates acides, l'émulsion en effet dans ces conditions est mauvaise et se défait rapidement, mais l'expérience montre qu'en attendant suffisamment longtemps et en favorisant la réaction par une légère augmentation de température, les phosphates acides sont produits par hydrolyse de composés phosphorés ; le milieu acide est constitué, la saponification débute. Cette marche doit représenter le phénomène tel qu'il se passe dans la graine, l'absorption lente de l'eau permettant au début de la germination l'hydrolyse nécessaire à la constitution du milieu acide sans déterminer la destruction brutale de la substance activante.

Ainsi, la substance saponifiante de la graine de ricin n'agit qu'en présence d'un milieu formé de phosphates acides. La graine germée réalise ce milieu.

Il nous est donc permis de conclure : *le milieu acide nécessaire à la saponification est constitué dans les graines oléagineuses par les phosphates acides de magnésium, calcium, potassium en présence d'une quantité très minime d'acide phosphorique libre*. Ce milieu est réalisé dès le début de la germination par l'hydrolyse des composés organiques phosphorés, à reste phosphorique, dont nous avons constaté nettement l'existence dans la graine de soleil et dans celle de ricin.

VI. ÉTUDE ET CRITIQUE DE QUELQUES EXPÉRIENCES ANTÉRIEURES

M. Nicloux dans sa thèse : Contribution à l'étude de la saponification des corps gras, a étudié l'influence de nombreuses substances sur la saponification de la plupart des huiles commerciales, en présence du cytoplasme de la graine de ricin. Dans ses expériences menées avec des corps déterminés, pris sous des concentrations variées, il n'y avait aucun essai de réaliser un milieu naturel analogue à celui d'une graine germée, M. Nicloux ne s'étant pas préoccupé d'une recherche de ce genre. Mais parmi les corps qu'il a utilisés, certains se rencontrent normalement dans la graine d'*Hélianthus annuus*, en particulier, le phosphate monocalcique, l'acide phosphorique, le sulfate de magnésium. Il est donc intéressant d'étudier les expériences faites et de voir si elles présentent dans leurs données quelque rapport avec celles décrites précédemment.

Leur lecture donne des indications très intéressantes venant confirmer les résultats que j'ai obtenus. Ainsi, les expériences réalisées avec le phosphate acide de calcium ont donné les meilleurs résultats avec les concentrations de 10/1.000 et 6/1.000, j'avais choisi 7/1.000 comme concentration correspondant à celle de la graine de Soleil. Les expériences réalisées avec le phosphate acide de calcium et le sulfate de magnésium ont donné le rendement maximum avec des concentrations de 21,25 0/00 et 19,5 0/00, elles se rapprochent de la concentration 15 0/00 que j'avais utilisée. Dans le cas de l'acide phosphorique seul, c'est une concentration de 0,57 0/00 qui donne le rendement maximum, elle est à peu près identique à celle calculée.

Ce n'est donc pas par un simple effet du hasard que ces concentrations ont donné les résultats les plus satisfaisants, mais bien certainement parce qu'elles se rappro-

chaient le plus des conditions naturelles réalisées dans la graine.

M. Nicloux a attribué dans sa thèse un rôle *prépondérant dans la saponification accomplie chez les graines, au gaz carbonique*. Il s'appuie pour cela, sur l'expérience suivante : huile et cytoplasme sont placés dans l'eau distillée chargée de gaz carbonique, le mélange est placé dans un flacon contenant du gaz carbonique et hermétiquement clos, la saponification se produit activement pour certaines huiles comme l'huile de coton, l'huile de sésame ; assez modérément pour d'autres, en particulier, chose curieuse pour l'huile de ricin, le cytoplasme de la graine de ricin ne saponifiant que 37,8 0/0 d'huile au bout de 24 heures, quantité faible comparée à celles obtenues avec d'autres acides.

L'objection principale que l'on peut faire à cette manière de voir, tient dans la différence profonde existant entre les conditions de l'expérience et celles de la germination. La graine ne vit pas dans un milieu de gaz carbonique, bien au contraire, et l'étude du quotient respiratoire prouve une absorption d'oxygène intense à ce moment, de beaucoup supérieure à la quantité de gaz carbonique dégagé dans le même temps. Ainsi si le gaz carbonique en dissolution peut comme tout autre acide (mais souvent moins bien), favoriser la saponification, l'expérience précédente ne prouve pas qu'il en soit le facteur essentiel dans la germination. L'expérience 10 indiquée p. 101, réalisée dans les conditions les plus proches de la germination, démontre la production du phénomène lipolytique sans intervention d'acide carbonique.

Un autre point de l'étude de M. Nicloux sur lequel je désire attirer l'attention est la *saponification par le cytoplasme en présence de sels neutres*. Théoriquement, cette saponification semble impossible puisque le phénomène est déterminé par la présence des ions H ou OH et que les sels neutres ne modifiant pas l'état de dissociation de l'eau, ne créent donc aucun excès d'ions acides ou basiques capables de déterminer la réaction saponifiante.

Il me semble que le cytoplasme, dans le cas où se produit cette saponification en présence des sels neutres,

n'intervient pas seulement par sa nature diastasique supposée, mais aussi par l'apport des sels minéraux acides qu'il renferme. C'est à ces sels ou à d'autres résultant de phénomènes de double décomposition avec les solutions neutres utilisées, que l'on doit, suivant mon opinion, attribuer la formation des ions H ou OH nécessaires à la saponification. L'étude rapide de la graine de ricin confirme, comme on l'a vu plus haut, cette supposition. L'expérience 10 effectuée en présence d'eau seulement, la démontre d'une façon satisfaisante.

VII. MODE D'ACTION DE LA SUBSTANCE ACTIVANTE DE LA SAPONIFICATION

L'action du cytoplasme du ricin a été attribuée par M. Nicloux à une substance dont l'intervention semblable à celle des diastases détermine une saponification extrêmement rapide. Il est permis de se demander, en présence des résultats totalement différents obtenus avec la graine d'Hélianthus, pourquoi une pareille substance ne s'y révèle pas en provoquant les mêmes effets. On ne peut songer ici à une spécificité d'action de la part de la diastase supposée existante puisque son rôle a été recherché avec l'huile même qu'elle devrait naturellement saponifier. D'autre part, le cytoplasme du ricin saponifie toutes les variétés d'huiles possibles et en particulier celle de Soleil.

L'examen comparatif des émulsions d'huile et des solutions acides ou salines en présence des cytoplasmes correspondant à ces deux graines, permet d'apporter quelque lumière sur leur profonde différence d'action.

Si l'on agite l'huile de Soleil avec la solution acide et le cytoplasme du ricin, on obtient une émulsion très facile et très complète. L'examen microscopique de l'émulsion révèle une consistance presque visqueuse due à la présence de gouttelettes huileuses extrêmement nombreuses et de dimensions très petites. Pour 100 gouttelettes de 0 cm. 012 observées sur un espace déterminé, on ne compte qu'une goutte de 0 cm. 15, 12 de 0 cm. 05. Un simple calcul permet d'évaluer à plus de 1.000.000 le nombre des gouttelettes provenant de l'émulsion d'un cm³ d'huile. Abandonnée à elle-même, l'émulsion persiste et la saponification se poursuit sans même agiter le mélange. Le pouvoir émulsionnant de la graine de ricin est donc énorme.

Si l'on étudie l'émulsion de l'huile et des solutions aqueuses, en présence du cytoplasme de la graine de

Soleil, l'aspect est tout autre. En premier lieu, l'émulsion n'a aucune stabilité ; dès que l'agitation cesse, la séparation de l'huile et de la solution saline se produit pour devenir rapidement totale. Au microscope, l'examen révèle un aspect tout à fait liquide, de globules huileux peu serrés et dont les dimensions sont en moyenne de 0 cm. 15, soit 700 à 800 gouttelettes au cm³.

Un des moyens attribués aux catalyseurs pour augmenter la vitesse des réactions chimiques est l'accroissement de la surface de contact des corps réagissant : il semble tout à fait logique d'attribuer à une cause analogue, pour une partie tout au moins, la différence si grande observée dans les saponifications par le ricin et la graine de Soleil. Le cytoplasme du ricin détermine par son action, une division de la matière grasse comparable à celle existant dans les cellules de la graine elle-même, division stable accroissant d'une façon énorme et durable les surfaces de contact de l'huile et de l'acide en réaction.

Le cytoplasme de la graine de Soleil ne détermine en rien un phénomène analogue, non seulement l'émulsion est grossière, mais encore elle ne persiste pas. Une des conditions physiques essentielles de la saponification n'étant pas réalisée, il n'y a rien d'extraordinaire à ce que la vitesse de réaction soit extrêmement lente pour ne pas dire nulle. Cette observation peut se confirmer également par une des expériences de M. Nicloux, l'action du cytoplasme si actif du ricin, sur le suif, est excessivement faible, tant que l'émulsion de celui-ci n'est pas faite convenablement.

Un des modes d'action de la substance cytoplasmique est donc évidemment la réalisation d'une émulsion stable. Quelle substance de la graine du ricin possède ce pouvoir, c'est que seule une analyse très minutieuse pourrait peut-être déceler ; tout au moins, l'étude précédente permet de jeter quelque lumière sur le pouvoir trop souvent mystérieux attribué aux diastases. Si l'on remarque que cette émulsion ne persiste pas lorsque le milieu est formé d'eau pure et non de phosphates acides, on est obligé d'attribuer un rôle considérable à ces sels dans le rôle émulsif de la diastase supposée en action. La

substance activante n'est pas altérée dans le broyage de la graine, il n'en est certainement pas de même pour la graine d'Hélianthus, puisque le broyage de celle-ci effectué dans n'importe quelles conditions (à l'abri de l'eau ou en sa présence) détermine sa disparition.

Expériences

J'ai essayé de reproduire par l'emploi de procédés divers une émulsion comparable à celle réalisée par la graine de ricin et d'observer si cette émulsion étant réalisée en présence de la graine de Soleil, un accroissement de la saponification s'ensuivrait.

Une *première expérience* a consisté en l'emploi d'un procédé purement mécanique pour la division de l'huile. Au moyen d'un appareil rotatif à fouet analogue à celui utilisé par les ménagères, le mélange huile, solution acide, a été brassé pendant une heure. L'émulsion obtenue est plus fine que celle réalisée par la graine par l'agitation au moyen d'un chariot animé, d'un mouvement de va-et-vient, les globules gras ont en moyenne 0 cm. 11, mais aucune stabilité n'existe. L'étude chimique de l'émulsion n'indique aucun accroissement de la vitesse de la saponification.

Une *seconde expérience* a été pratiquée avec l'emploi d'un corps facilitant l'émulsion des huiles en présence de solution aqueuse : l'albumine de l'œuf. L'émulsion obtenue offre une viscosité assez comparable à celle réalisée par l'emploi du ricin, mais la grosseur des globules devient énorme : 0 cm. 25 en moyenne, souvent 0 cm. 80. Aucune augmentation de la vitesse de saponification n'est obtenue encore. Si l'émulsion est stable, la grosseur des globules est bien trop forte, aucun accroissement des surfaces de contact n'est réalisé, bien au contraire.

Une *troisième expérience* a été faite aussi en agitant le mélange avec des corps extrêmement divisés et inertes (alumine en poudre : achromine du commerce). Au bout de 2 heures d'agitation, l'étude indique une saponification à peu près nulle, le résultat est semblable après 25 heu-

res. L'émulsion assez fine (les grains ont 0 cm. 10 à 0 cm. 25), ne présente aucune stabilité.

Pour terminer ces quelques mots relatifs à l'action de la substance lipolytique, il est de toute évidence que les réactions chimiques de saponification à l'intérieur de la graine sont activées par d'autres interventions que l'accroissement des surfaces de contact des corps réagissant, en particulier par la température. L'oxydation des acides gras dans la graine dégage une quantité de chaleur fournissant un apport important d'énergie qui sera utilisé pour aider la réaction endothermique de saponification. L'enveloppe de cellulose, isolant thermique très actif, constituée par le péricarpe, doit jouer un rôle certain dans le maintien de cette énergie calorifique à l'intérieur de la germination. Aussi la graine réalise naturellement une seconde condition activante de la vitesse des réactions chimiques, l'élévation de température, elle met en œuvre les données physico-chimiques que le chimiste a mis si longtemps à découvrir et à utiliser d'une façon raisonnée.

CHAPITRE IV

RÉSUMÉ GÉNÉRAL. CONCLUSIONS

Je m'étais proposé, en abordant ces recherches, d'apporter une contribution à l'étude des transformations des réserves grasses des graines, en choisissant comme sujet d'étude la graine de Soleil (*Hélianthus annuus*), ces transformations étant étudiées non pas indépendamment de la graine, mais dans le milieu même ou tout au moins dans les conditions les plus voisines du milieu qu'elle réalise lors de la germination.

Les observations que j'ai pu faire confirment pour les unes des faits observés sur d'autres types de graines oléagineuses (ricin spécialement) ; infirment, pour les autres, certaines conclusions présentées au sujet de la dégradation des réserves grasses. J'ai acquis également des résultats nouveaux.

I. CONCLUSIONS RELATIVES A L'ÉVOLUTION DES RÉSERVES GRASSES CONSIDÉRÉES EN ELLES-MÊMES

1° *La quantité de réserves grasses* de la graine de Soleil diminue rapidement au début de la germination; la diminution est ensuite moins marquée, mais toujours régulière. Cette observation confirme des résultats connus depuis longtemps sur diverses graines oléagineuses.

2° *Le poids moléculaire moyen des acides gras* contenus dans les glycérides de la graine de Soleil reste sensiblement le même pendant une bonne partie de la durée germinative. Il est égal alors au poids moléculaire des acides de la graine non germée. Ensuite, ce poids moléculaire se relève progressivement et sensiblement vers la fin du phénomène. Cette étude du poids moléculaire, faite par la méthode tonométrique, est nouvelle, elle permet d'obtenir des conclusions intéressantes.

3° *La teneur en acides gras libérés au cours de la germination* atteint rapidement une valeur assez forte. Cette valeur se maintient ensuite sensiblement constante pour ne se relever que vers la fin de la période germinative.

4° La première transformation des réserves grasses consiste en une *saponification*, le fait est indiqué depuis longtemps, mais l'étude du poids moléculaire moyen des acides et sa valeur constante dans une longue durée de la germination le confirme, le relèvement final du poids moléculaire ne vient pas à l'encontre de cette hypothèse. Il n'y a donc pas oxydation préalable des glycérides, puis saponification comme on le constate *in vitro* chez les huiles siccatives.

Au cours de cette saponification, les acides gras libérés sont faciles à déceler, je n'ai, pas plus que mes prédécesseurs, pu découvrir la glycérine parmi les produits extraits des graines d'Hélianthus en voie de germination.

5° *L'utilisation des acides gras libérés est un phénomène continu* (la valeur de l'indice d'acide et les proportions d'acides calculées d'après l'indice le prouvent). Cette utilisation commence par l'emploi des acides non saturés, comme le démontre l'examen du poids moléculaire (acide oléique, acide linoléique pour la graine d'Hélianthus). Le même examen prouve qu'il n'y a pas de simplification *visible* de la molécule des acides gras primitifs pour *constituer d'autres acides gras à structure plus simple*, mais oxydation et destruction rapide des acides primitifs pour donner des composés aldéhydiques, et des produits de combustion ultime comme le gaz carbonique. Les composés aldéhydiques se décèlent dans la graine de Soleil, de même que des corps peroxydés. Les acides gras saturés ne semblent pas être utilisés dans ces transformations, ils ne le sont sûrement pas au début et pendant une longue période du phénomène. Cette marche, lors de la dégradation des acides gras issus de la saponification, n'avait pas été envisagée ainsi jusqu'à présent, ni reçu une démonstration au moins partielle, comme dans ce travail.

II. COMPOSITION MINÉRALE DU MILIEU FORMÉ PAR LA GRAINE GERMÉE

L'analyse chimique des cendres de la graine mûre, l'analyse d'extraits aqueux provenant de la graine germée ou non, l'analyse spectrographique, l'analyse histo-chimique faite sur les coupes minces du végétal étudié dénotent comme éléments minéraux de la graine d'Hélianthus (indépendamment de C. H. O. N.) : Potassium :

$\frac{78}{10.000}$; Phosphore : $\frac{78}{10.000}$; Magnésium : $\frac{31}{10.000}$; Cal-

cium : $\frac{20}{10.000}$; Aluminium : $\frac{6,6}{10.000}$; Fer : $\frac{0,6}{10.000}$; Sili-

cium : $\frac{3}{10.000}$; Soufre : $\frac{1}{10.000}$; Manganèse, Chlore, Zinc

(ces trois derniers éléments à l'état de traces).

L'état de ces éléments dans la graine germée de Soleil peut s'établir ainsi :

Le *Phosphore* est essentiellement à l'état organique (phytine des grains d'aleurone, phosphatides, protéides phosphorées). Il faut admettre parmi certains de ces corps la présence d'un complexe renfermant PO^+K^2 . Lors de la germination, l'hydrolyse des composés phosphorés conduit à la formation de phosphates acides (K, Mg, Ca) et aussi à une faible quantité d'acide phosphorique libre.

Le *Potassium* se trouve dans la graine non germée sous la forme de phosphate neutre, POK^2H , et d'un complexe $\text{PO}^+\text{K}^2\text{R}$, R représentant un reste organique ; il doit exister aussi à l'état de chlorure. Dans la germination, le potassium se trouve sous l'état de phosphate acide PO^+KH^2 , également à l'état de chlorure et de sulfate.

Le *Magnésium* de la graine est à l'état de combinaison organique ; au cours de la germination, il apparaît à l'état minéral : phosphate acide $(\text{PO}^+)^2\text{MgH}^4$, sulfate.

Le *Calcium* existe dans la graine à l'état organique, il

se rencontre encore à cet état dans la germination, mais aussi se minéralise : phosphate acide $(\text{PO}^4)^{3-}\text{CaH}^+$, sulfate.

Le *Fer*, l'*Aluminium*, le *Soufre* organiques dans la graine se minéralisent également au cours de la germination.

Le *Chlore* est à l'état de chlorure (K) pendant toute la durée de la vie de la graine.

En définitive :

La graine de Soleil *non germée* constitue un *milieu neutre* où les sels minéraux proprement dits sont rares (sels de potassium).

La graine de Soleil *germée* constitue un *milieu acide* où les sels minéraux sont devenus abondants : phosphates acides, acide phosphorique libre, sulfates, chlorures (K, Mg, Ca, Al, Fe).

L'hydrolyse des composés phosphorés organiques nécessaire à la libération des sels acides commence immédiatement, dès le début des phénomènes germinatifs ; ce phénomène précède certainement la saponification.

La détermination précise qualitative et quantitative du milieu minéral constitué dans une graine oléagineuse germée, n'avait pas encore été faite.

Cette étude des graines, poursuivie par des méthodes diverses, prouve que *l'acidité des graines oléagineuses en germination n'est pas le fait seulement des acides gras libérés, mais surtout des phosphates acides et de l'acide phosphorique produits dès le début de la germination*. Ce résultat nouveau précise d'une façon satisfaisante les conditions de milieu où s'accomplissent les phénomènes chimiques de la germination, saponification spécialement.

La *localisation des éléments minéraux*, difficile à déceler, prouve dans l'ensemble une migration vers les points de croissance de la plantule. Ce fait est particulièrement net pour le potassium, le phosphore, le magnésium.

III. INFLUENCE DU MILIEU MINÉRAL DE LA GRAINE GERMÉE SUR LA SAPONIFICATION

Les faits connus jusqu'à présent sur ce point se résument ainsi : la saponification dans les graines oléagineuses se produit en milieu acide, sous l'influence activante d'une substance à action diastasique, étudiée surtout dans la graine de ricin.

Cette substance, que l'on n'a d'ailleurs pas encore isolée, existe dans le cytoplasme de la graine, à l'exclusion des grains d'aleurone (M. Nicloux). Son action a été étudiée en présence de divers composés minéraux : acides, sels acides ou neutres ; mais ces corps n'ont jamais été envisagés ou recherchés par les auteurs comme constituants du milieu naturel réalisé dans la graine germée. L'acidité de ce milieu a été attribuée soit aux acides gras, soit à l'acide carbonique.

Sur ces différents points, mes recherches ont abouti aux résultats suivants :

1° *Le cytoplasme de la graine d'Hélianthus annuus* préparé dans les mêmes conditions que celui de la graine de ricin et agissant dans un milieu identique, *n'a pratiquement aucun pouvoir saponifiant*. La méthode de M. Nicloux concernant la séparation de l'agent lipolytique, n'a donc pas, semble-t-il, de valeur générale, puisque si elle conduit à d'excellents résultats avec le ricin (graine à peu près exclusivement étudiée à ce point de vue jusqu'à ce jour), elle échoue avec la graine oléagineuse de Soleil. D'autre part, la graine de Soleil, germée ou non, prise dans son intégralité mais *broyée*, n'est pas douée non plus du pouvoir saponifiant.

2° *Le milieu saponifiant de la graine d'Hélianthus germée* est formé surtout par un *mélange de phosphates acides* (K, Mg, Ca) et d'*acide phosphorique*, celui-ci étant

en quantité très faible. L'étude de l'acidité réelle de ce milieu le démontre.

C'est à ces composés et non à l'acide carbonique ou aux acides gras qu'il faut attribuer l'acidité de la graine germée, acidité indispensable pour la saponification.

Le milieu saponifiant de la graine de ricin est sensiblement le même.

3° La *saponification de l'huile de Soleil* effectuée par l'emploi du cytoplasme du ricin et de solutions de phosphates acides (en présence ou non d'acide phosphorique) se fait avec une *rapidité extrême* si les *concentrations* des solutions utilisées correspondent à celles observées dans la graine germée.

La vitesse du phénomène est plus grande par l'emploi des phosphates acides que par celui de l'acide phosphorique seul.

Si la saponification est opérée en présence uniquement d'eau et de cytoplasme, la réaction ne s'effectue pas immédiatement, mais, dès que l'hydrolyse a libéré les phosphates acides nécessaires, le phénomène apparaît et se poursuit avec rapidité. Ce résultat montre nettement *l'influence des phosphates acides sur la réaction lipolytique*; la saponification très rapide, observée alors, s'explique ainsi d'une façon beaucoup plus plausible qu'en admettant l'intervention de l'acide carbonique.

La vitesse de saponification la plus forte est obtenue avec les phosphates acides de magnésium, puis de calcium; le *rôle actif du magnésium* est à rapprocher de la *richesse particulière* en ce métal des *graines oléagineuses*, celui du calcium correspond aux données acquises sur son influence dans des réactions de nature diastatique (action de la sucrase).

4° La saponification réalisée dans les graines oléagineuses par l'intervention des ions acides, sera évidemment activée par la production d'une émulsion fine, stable, déterminant un contact étroit entre les composés chimiques réagissant.

L'étude microscopique des émulsions réalisées par le cytoplasme de la graine de ricin montre qu'en milieu

phosphaté acide, ce cytoplasme jouit à un très haut degré du pouvoir émulsionnant (1.000.000 gouttelettes par cm³ d'émulsion) ; il ne le présente que très peu en milieu neutre. Quel que soit le milieu, le cytoplasme de la graine de Soleil broyée ne possède pas ce pouvoir et ne détermine pas la saponification. Il résulte de ces observations quelques éclaircissements sur le mode d'action de la substance lipolytique ; ce rôle peut, en partie tout au moins, se comprendre par la production de l'émulsion et le maintien de sa stabilité.

Les graines oléagineuses renferment donc un agent chimique de nature diastasique, ou possèdent une structure physico-chimique spéciale, déterminant l'émulsion.

Cet agent ou cet état persistent malgré le broyage dans la graine de ricin, mais *n'agissent qu'en milieu acide* ; ils disparaissent par contre dans la graine de Soleil pareillement traitée. Cette disparition peut aussi se constater dans la graine de ricin âgée.

BIBLIOGRAPHIE

I

OUVRAGES GÉNÉRAUX

ABDERHALDEN : *Handbuch der biochemisches Arbeitsmethoden.*

— *Biochemisches Handlexikon.*

ANDRÉ (C.) : *Chimie végétale*, 1909.

BARDET (J.) : *Atlas de spectres d'arc*, 1927.

BEHRENS (W.) : *Hilfsbuch zur Anführung mikroskopischen Untersuchungen*, 1883.

BEHRENS (H.) : *Mikrochemische Analyse organischer Verbindungen Heft*, I-IV, 1895, 97. *Ferner Anleitung zur Mikrochemischen Analyse*, 2 Aufl., 1899. *Mikrochemische Technik*, 1900.

BEHRENS (H.) et KLEY : *Mikrochemische Analyse*, 1915.

CZAPECK : *Biochemie der Pflanzen*, 2^e éd., 1920.

DONAU (J.) : *Die Arbeitsmethoden der Mikrochemie*, 1914.

EMICH (F.) : *Lehrbuch der Mikrochemie*, 1911.

GRAFE : *Chemie der Pflanzenzelle*, 1922.

EULER : *Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie*, 1908.

GAIN : *Précis de chimie agricole*, 1918.

LECLERC DU SABLON : *Traité de Physiologie végétale et agricole*, 1911.

MAQUENNE : *Traité de Physiologie végétale*, 1922.

MOLLIARD : *Nutrition de la Plante*, 1919-1925.

MOLISCH (H.) : *Mikrochemie der Pflanze*, 1922.

LUNGE-BERL : *Chemisch-technischen Untersuchungsmethoden*, tome II, 1922.

POULSEN (V.-A.) : *Botanische Mikrochemie*, 1881.

ROSENTHALER : *Der Nachweiss organischer Verbindungen*, 1914.

SCHLOESING Fils (Th.) : *Principes de chimie agricole*.

TUNMANN (O.) : *Pflanzenmikrochemie*.

WIESNER : *Die Rohstoffe der Pflanzenreiches*, 1900-1913.

II

ÉLÉMENTS MINÉRAUX

Potassium

BEHRENS (H.) : Anleitung zur Mikrochemischen Analyse.

MACALLUM : On the distribution of Potassium in animal and végétable cells (*Journ. of Physiology*, 1905, vol. XXXII, p. 95).

WEEVERS (Th.) : Untersuchungen über die lokalisation und Fonction des Kaliums in der Pflanze (*Recueil des Travaux Bot. Néerlandais*, 1911, vol. VIII, p. 289).

Magnésium

MONTEVERDE : Über die Ablagerung von Calcium und Magnesium in der Pflanze (*Référ. Bot. Zbl.*, 1890, Bd XLIII, p. 327).

RICHTER : Untersuchungen über das Magnesium und seine Beziehungen zur Pflanze (*Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien.*, 1902, Bd. CXI, p. 171).

Calcium

HAUSHOFER : Mikroskopische Reaktionen, Braunschweig, p. 33, 1885.

KISSER : Über den Mikrochemischen Nachweiss gelöster Kalciumsalze als Kalziumtartrat (*Beih. z. bot. Zbl.*, 1922, Bd. XXXIX, p. 116).

MOLISCH : Über den Nachweiss von Kalk mit Kalilauge und Kohlensäuren Kali (*Ber. d. Deutsch. bot. Ges.*, 1916, Bd. XXXIV, p. 357).

MANGIN : Propriétés et réactions des composés pectiques (*J. de Bot.*, 1892, t. VI, p. 206, 235, 363).

Fer

- MACALLUM : On the demonstration of the présence or iron in Chromatus by microchemical méthodes (*Proceedings of the Royal Society of London*, 1892, vol. I, p. 280).
- MOLICH : Bemerkungen über den Nachweiss von maskierten Eisen (*Ber. d. D. bot. Ges.*, 1893, Bd. XI, p. 73).
- POLICARD : Détection histochimique du fer total dans les tissus par la méthode de l'incinération (*C. R. Ac. Sc.*, 23 avril 1923, p. 1187).
- WEISS (H.) und WIESNER : Vorläufige Notiz über die direkte Nachweisung des Eisens in den Zellen der Pflanze (*Sitz. ber. d. Kais. Akad. Wien.*, 1890, Bd. XL, p. 276).
- WIENER : Beitrag zum mikrochem. Nachweis des Eisens in der Pflanze insbesondere des « maskierten » (*Biochem. Zeitschrift*, 1916, Bd. LXXVII, p. 27).

Aluminium

- KRAIZMANN : Der Mikrochemische Nachweiss und die Verbreitung des Aluminiums in Pflanzenreich (*Sitzber. d. Kais. Akad. Wien*, 1913, p. 311).

Manganèse

- GÖSSL : Über das Vorkommen des Mangans in der Pflanze (*Beihefte z. Bot. Zbl.*, 1905, Bd. XVIII, p. 119).

Phosphore

- BERTHELOT (M.) et ANDRÉ (G.) : Sur le phosphore et l'acide phosphorique dans la végétation (*C. R. Acad. Sc. Paris*, t. CVI, 1888).
- IWANOFF : Das Auftreten und Schwinden von Phosphorverbindungen in der Pflanze (*Jahrb. f. wiss. bot.*, 1901, Bd. XXXV, p. 355).
- LILIENFELD u. MONTI : Über die mikrochemische Lokalisation des Phosphors in den Geweben (*Zeitschriftl. f. Physiol. Chemie*, 1893, vol. XVII, p. 410).
- MACALLUM : On the detection and localisation of Phosphorus in animal and vegetable cells (*Proc. Roy. Soc.*, 1898, vol. LXIII, p. 467).

POLLACCI : Intorno al miglior metodo di ricerca-micro-chimica del fosforo nei tessuti vegetali (*Atti dell'Istituto bo. dell'Univers. di Pavia*, 1900, 2^e série, vol. VI, p. 15).

SCOTT : On methods supposed to localise Phosphorus in cells (*Journ. of Physiol.*, 1897, vol. XXXV, p. 119).

Chlore

HAUSHOFER : Mikroskopische reaktionen, 1885, p. 121.

MACALLUM : On the nature of the silver reaction in animal and vegetable tissues (*Proc. Roy. Soc.*, 1905, vol. LXXVII, p. 165).

Silicium

HAUSHOFER : Mikroskopische Reaktionen, 1885, p. 121.

Acide azotique

ARNAUD et PADÉ : Recherche chimique de l'acide nitrique, des nitrates dans les tissus végétaux (*Compt. rendus Ac. Sc.*, 1884, t. XCVIII, p. 1488).

KLEIN : Über Nachweis und Vorkommen von Nitraten und Nitriten in Pflanzen (*Beihefte z. bot. zbl.*, 1913, Bd. XXX, p. 141).

MOLISCH : Über den mikrochemischen Nachweis von Nitraten und Nitriten in der Pflanze mittels Diphenylamin oder Brücein (*Ber. d. D. Bot. Ges.*, 1883, Bd. I).

III

RÉSERVES GRASSES

CONNSTEIN, HOYER, WARTENBERG : Über fermentative Fettspaltung (*Ber. der. Deutsch. chem. Gesells.*, 1902, t. XXXV, p. 3988).

DETMER : Phys. chem. Untersuchungen über die Keimung ölhaltiger Samen., 1875.

GREEN : On the germination of the Castor Oil plant. (*Proc. of the R. Soc. of London*, 1890, t. XLVIII, p. 370-392).

GREEN et JAKSON : Further observations on the germination of the feeds of the Castor oil plant. (*Proc. Roy. Soc.*, t. LXXVII, 1905, p. 69).

HERTWIG und UHLMANN : Über Nachweis fetter öle durch mikrochemische Verseifung (*Archiv. f. Pharm.*, 1903, p. 111).

INGLE : *J. Soc. Chem. Ind.*, p. 639, 1913.

IVANOW : Über die Stoffwechsel bei reifen ölhaltiger Samen nit besonderer Berücksichtigung der Ölbildungsprozesse (*Beirr. bot. Centralblatt*, t. XXIII, 1912, p. 159).

JORISSEN : *Chem. Zeitung*, t. XXIII, p. 162, 1898.

LAURENT : Recherches expérimentales sur la formation d'amidon dans les plantes aux dépens de substances organiques (*Soc. Roy. Bot. Belgique*, 1887, p. 24).

LECLERC DU SABLON : Recherches sur la germination des graines oléagineuses (*R. G. de Bot.*, 1895, p. 145).

— Sur les réserves oléagineuses de la noix (*R. G. de Bot.*, 1897, p. 313).

— Sur la germination des amandes (*R. G. de Bot.*, 1897, p. 1).

MAILLOT : Etude comparée du pin pignon et du ricin de l'Inde (*Thèse Pharm. Nancy*, 1880).

MAQUENNE : Sur les changements de composition qu'éprouvent les graines oléagineuses au cours de la germination (*C. R. Ac. Sc. Paris*, 1898, p. 626).

MESNARD : Sur les transformations que subissent les substances de réserve pendant la germination des graines (*Bul. Soc. Bot. de France*, t. 40, p. 35, 1893).

MAZE : Sur les transformations des matières grasses et sucrées dans les graines oléagineuses en voie de germination (*C. R. Ac. Sc. Paris*, 1902, p. 309).

MICHALLET : Contribution à l'étude de l'oxydation des huiles de poisson (*Thèse Ingénieur-Docteur Lyon*, 1928).

MILLER : A Physiological Study of the germination of *Hélianthus annuus* (*Ann. of Bot.*, t. XXIV, 1912, p. 693).

- MUNTZ : Sur la germination des graines oléagineuses (*Ann. de Chimie et de Physique*, 1871, 4^e série, t. XXII, p. 472).
- NICLOUX : Contribution à l'étude de la saponification de corps gras (*Thèse sciences, Paris*, 1906).
- NEMEK : Sur la concentration en ions H dans les tissus des graines (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLXXX, p. 1770).
- NJEGOVAN : Beitrage zur Kenntniss der Pflanzlichen Phosphatide (*Zeitsch. Phys. Chemie*, 1911, t. 76, p. 6).
- PELOUZE : Mémoire sur la saponification des huiles sous l'influence des matières qui les accompagnent dans les graines (*C. R. Ac. Sc.*, 1855, t. XI, p. 605).
- SACHS : Über das Auftreten der Stärke bei der Keimung ölhaltiger samen (*Bot. Zeit.*, t. XVII, 1859, p. 177).
- SCHMIDT : Über Aufnahme und Verarbeitung von fetter Oele durch Pflanzen (*Flora*, t. LXXIV, 1898, p. 300).
- SCURTI EPAROZZANI : Sul potere lipolitico dei semi di erotontigli (*Ann. d. R. Staz. Chem. Agra. Sperim. di Roma*, 1906-1907, t. II).
- SIEGMUND : Über fettspaltende Fermente im Pflanzenreich (*Monatsheft für Chemie*, 1890, p. 272).
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES MATIERES GRASSES DE LA GRAINE DE SOLEIL (HELIANTHUS ANNUUS). RECHERCHES SUR LEUR EVOLUTION PENDANT LA GERMINATION.

	Pages
I. Introduction	11
II. Proportion des matières grasses à différents moments de l'évolution de la graine	13
a) <i>Extraction</i>	13
b) <i>Réserves grasses de la graine non germée</i>	13
c) <i>Réserves grasses de la graine germée</i>	14
d) <i>Résumé des résultats obtenus. Conclusions</i>	14
III. Etude du poids moléculaire moyen des acides gras à différents stades de l'évolution de la graine	17
a) <i>Technique</i>	17
b) <i>Détermination du poids moléculaire</i>	18
c) <i>Appareil de Menzies</i>	19
d) <i>Opération</i>	20
e) <i>Résultats :</i>	22
IV. Etude de la valeur de l'indice d'acides gras libres à différents stades de l'évolution de la graine	25
a) <i>Technique</i>	25
b) <i>Graines non germées</i>	25
c) <i>Germinations</i>	25
d) <i>Résultats</i>	27

V. Conclusions relatives à l'évolution des matières grasses	28
VI. Recherches sur l'évolution ultérieure des acides gras libérés	31

CHAPITRE II

ETUDE DU MILIEU MINERAL CONSTITUE PAR LA GRAINE GERMEE

Etat chimique des éléments

Localisation, proportions à différents états de la graine

I. Introduction	35
II. Analyse des cendres	37
a) <i>Préparation des cendres</i>	37
b) <i>Méthode d'analyse des cendres</i>	38
c) <i>Composition des cendres</i>	42
d) <i>Remarques sur l'analyse des cendres</i>	43
III. Proportions réelles des éléments dans la graine de soleil	45
IV. Appendice : Nombre relatif d'atomes de chacun des éléments dans la graine	48
V. Analyse spectrographique	50
a) <i>Méthode</i>	50
b) <i>Résultats</i>	52
c) <i>Conclusions</i>	53
VI. Analyse histo-chimique de la graine de soleil..	54
1. <i>Structure histologique de la graine d'Hélianthus</i>	
Structure de l'Embryon	54
Structure des Cotylédons	57
2. <i>Analyse histo-chimique</i>	58
Technique	58
3. <i>Analyse d'extraits aqueux</i>	60
4. <i>Résultats</i>	60
PHOSPHORE	60
POTASSIUM	67

MAGNÉSIUM	71
CALCIUM	73
FER	76
ALUMINIUM	77
SOUFRE	77
CHLORE	77
ACIDE AZOTIQUE	78
ACIDE CARBONIQUE	78
VII. Résumé général et tableau d'ensemble.....	79

CHAPITRE III

INTERVENTION DES ELEMENTS MINERAUX DE LA GRAINE AU COURS DE LA SAPONIFICATION

I. Introduction	81
II. Préparation de la substance lipolytique	84
III. Saponification de l'huile de soleil en présence des substances minérales de la graine germée de la graine de soleil	86
<i>Concentration des solutions utilisées</i>	<i>86</i>
a) Concentration en phosphate monopotassique..	88
b) Concentration en phosphate monomagnésien..	88
c) Concentration en phosphate acide de chaux ...	89
d) Concentration en acide phosphorique	89
e) Concentration en sulfates	90
<i>Saponification en présence du cytoplasme</i>	<i>90</i>
Technique des expériences	90
Résultats	92
<i>Saponification en présence de la graine complète....</i>	<i>96</i>
Données des expériences	96
Résultats	96
IV. Saponification de l'huile de soleil en présence de la graine de ricin et des substances minérales de la graine germée	99
Résultats	99
V. Conclusions	102
VI. Etude critique de quelques expériences anté- rieures	104

VII. Mode d'action de la substance activante de la saponification	107
--	------------

CHAPITRE IV

RESUME GENERAL. CONCLUSIONS

I. Conclusions relatives à l'évolution des réserves grasses considérées en elles-mêmes	112
II. Composition minérale du milieu formé par la graine germée	114
III. Influence du milieu minéral de la graine germée sur la saponification	116

BIBLIOGRAPHIE

I. Ouvrages généraux	119
II. Eléments minéraux	120
III. Réserves grasses	122

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTE

1. LES MARSUPIAUX

2. LE MÉTAMORPHISME

Lu et accepté :

Vu et approuvé :

Les Membres du Jury :

*Pour le Doyen de la Faculté
des Sciences de Lyon :*

MM. COUTURIER,
C. VANEY,
F. ROMAN.

L'assesseur,
R. KÖHLER.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 4 mai 1929.

*Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
J. GHEUSI.*

CAHORS, IMP. COUESLANT (*personnel intéressé*). — 38.326
